

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MED. JÜRGEN SCHÖLMERICH
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE QUANTIFIZIERUNG
VON HUMANPATHOGENEN MIKROSPORIDIEN
IN PROFESSIONELLEN UND NICHT-PROFESSIONELLEN PHAGOZYTEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Norbert Johannes Paul Zitzler
aus Schwandorf

2009

Dekan

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Bernhard Weber

Prof. Dr. Caspar Franzen

Prof. Dr. Ralf Wagner

16.03.2010

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	1
2. Einleitung.....	2
2.1. Problemstellung.....	2
2.2. Historischer Hintergrund.....	2
2.3. Taxonomie und Phylogenie.....	4
2.4. Morphologie und Entwicklungszyklus.....	6
2.4.1. Die Spore.....	7
2.4.2. Infektion der Wirtszelle.....	8
2.4.3. Merogonie und Sporogonie.....	9
2.5. Charakteristika von Encephalitozoon und Vittaforma.....	11
2.5.1. Encephalitozoon spp.....	11
2.5.1.1. E. cuniculi.....	11
2.5.1.2. E. hellem.....	12
2.5.1.3. E. Intestinalis.....	12
2.5.2. Vittaforma corneae	12
2.5. Epidemiologie und Übertragung	13
2.6. Klinische Manifestation	14
2.7. Diagnostik	16
2.8. Therapie.....	17
3. Material und Methoden	18
3.1. Zellkultur.....	18
3.1.1. Zelllinien	19
3.1.2. Methoden der Zellkultivierung.....	19
3.2. Mikrosporidien	20
3.2.1. Gewinnung der Sporen.....	21
3.3. Herstellung der polyklonalen Antiseren.....	21
3.4. Infektion der Zelle	22
3.5. Immunfluoreszenzfärbung der intrazellulären Parasiten.....	22
3.6. Durchflusszytometrie	23
3.6.1. Prinzip	23
3.6.1.1. Das strömungsmechanische Prinzip.....	23
3.6.1.2. Das optische System.....	24
3.6.2. Geräteeinstellung.....	24
3.7. Quantifizierung der Sporen	25
3.7.1. Auswertung Punktwolke	25
4. Ergebnisse.....	28
4.1. Darstellung der Fluoreszenzzunahme im Vergleich der Mikrosporidienart.....	28
4.2. Darstellung der Fluoreszenzzunahme im Vergleich der Zellarten	33
5. Diskussion	37
6. Zusammenfassung und Ausblick.....	40
7. Literaturverzeichnis	41
8. Lebenslauf	52
9. Danksagung	53

2. Einleitung

2.1. Problemstellung

Mikrosporidien sind obligat intrazelluläre Parasiten, die ein weites Spektrum an Vertebraten und Nichtvertebraten infizieren. Aus noch nicht bekannten Gründen sind verschiedene Mikrosporidienarten verantwortlich für unterschiedliche klinische Symptome beim Menschen. Zum einen könnten die unterschiedlichen Mikrosporidien spp. durch unterschiedliche Übertragungswege verschiedene Organsysteme befallen. Zum anderen könnten die unterschiedlichen Mikrosporidienarten unterschiedliche Affinitäten zu verschiedenen Zellen aufweisen und dadurch unterschiedliche Symptome hervorrufen. In dieser Arbeit soll die Aufnahme der Sporen von vier verschiedenen humanpathogenen Mikrosporidien in unterschiedliche Zelllinien quantifiziert werden. Ziel ist es herauszufinden, ob die Menge aufgenommener Sporen verschiedener Mikrosporidien sich insgesamt voneinander unterscheidet oder eine Affinität zu bestimmten Zellsorten besteht.

2.2. Historischer Hintergrund

Mitte des 19. Jahrhunderts wurden Mikrosporidien als Verursacher der „Pebrine (Pfeffer) Erkrankung“ bei Seidenraupen entdeckt und zerstörten beinahe diesen Industriezweig. In den darauf folgenden Jahrzehnten traten diese Parasiten auch bei Honigbienen und Fischen in Erscheinung und führten auch in diesen Industriezweigen zu signifikanten Verlusten [21,60,106]. Wright und Craighead [107] entdeckten 1922 *Encephalitozoon cuniculi* in Hasen und beschrieben so zum ersten Mal eine Infektion durch Mikrosporidien bei Säugetieren. Heute ist bekannt, dass Mikrosporidien Labortiere und auch Haustiere der unterschiedlichsten Arten infizieren [23,93,102]. 1959 wurde von Matsubayashi et al. die erste menschliche Infektion, bei einem neunjährigen Jungen mit Kopfschmerzen, Fieber und Krämpfen, aufgrund von *Encephalitozoon* spp. dokumentiert [72]. Bis zur AIDS Pandemie in den 80iger Jahren wurden nur acht Fälle von menschlicher Mikrosporidiose beschrieben [37]. 1985 wurde in Frankreich ein neues Mikrosporidium, *Enterocytozoon bieneusi*, im gastrointestinalen Epithel eines HIV infizierten Patienten entdeckt [18]. 1991 wurde eine zweite Art von *Encephalitozoon*, *Encephalitozoon hellem*, als Verursacher von

Keratokonjunktivitis bei einem HIV Patienten entdeckt [20]. Ein Jahr darauf wurde eine Encephalitozoon-ähnliche Art, jetzt bekannt als Encephalitozoon intestinalis, als weiterer Verursacher von Infektionen in HIV Patienten entdeckt [80,82]. Seit dieser Zeit gelten Mikrosporidien als opportunistische Erreger verschiedener Erkrankungen bei Patienten mit AIDS [101] und bei medikamentös immunsupprimierten Patienten nach Organtransplantationen [61,85,89]. Es bestehen allerdings auch vereinzelte Berichte, dass ansonsten gesunde Erwachsene, Kinder und Reisende aufgrund von Mikrosporidien an Durchfällen litten, die allerdings selbstlimitierend waren [21]. Die ersten Infektionen durch E. bienewisi und E. intestinalis bei Patienten, die nicht HIV infiziert waren, wurden 1994 und 1995 durch Flepp et al. und Sandfort et al. beschrieben [29,88]. Nur sieben Gattungen sind, neben Infektionen mit unklassifizierten Mikrosporidien, als humanpathogen beschrieben worden: Brachiola, Enterocytozoon, Encephalitozoon, Pleistophora, Trachypleistophora, Vittaforma und Nosema [39,71,102].

Spezies	Entdeckungs-		Anzahl der bestätigten Patienten		Organsystem	Andere Wirte
	Wirt	Jahr	Immun-supprimiert	Immun-kompetent		
<i>Enterocytozoon bienewisi</i>	Mensch	1985	> 1000	< 20	Gastrointestinaltrakt, Gallenwege, Respirationstrakt	Vertebraten
<i>Encephalitozoon hellem</i>	Mensch	1991	< 50	3	Auge, Respirationstrakt, Harnwege, Systemische Infektion	Vögel
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	Mensch	1993	< 200	2	Gastrointestinaltrakt, Gallenwege, Respirationstrakt, Knochen, Haut, systemische Infektion	Säugetiere
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	Kaninchen	1923	< 20	-	Systemische Infektion, Auge, Respirationstrakt, Harnwege, Leber, Peritoneum, Gehirn	Säugetiere
<i>Vittaforma corneae</i>	Mensch	1990	1	3	Auge, Harnwege	Unbekannt
<i>Vittaforma ähnlich</i>	Mensch	2003	22	3	Gastrointestinaltrakt	Unbekannt
<i>Pleistophora ronneafiei</i>	Mensch	1985	1	-	Muskel	Unbekannt
<i>Trachypleistophora hominis</i>	Mensch	1996	1	1	Muskel, Auge	Unbekannt
<i>Trachypleistophora anthropophthera</i>	Mensch	1998	3	-	Systemische Infektion, Auge	Unbekannt
<i>Brachiola algerae</i>	Mosquito	1970	1	1	Auge, Muskel	Moskito
<i>Brachiola connori</i>	Mensch	1974	1	-	Systemische Infektion	Unbekannt
<i>Brachiola vesicularum</i>	Mensch	1998	1	-	Muskel	Unbekannt

<i>Nosema ocularum</i>	Mensch	1991	-	1	Auge	Unbekannt
<i>Microsporidium ceylonensis</i>	Mensch	1973	1		Auge	Unbekannt
<i>Microsporidium africanum</i>	Mensch	1981	1		Auge	Unbekannt

Tabelle 1: Humanpathogene Mikrosporidien nach Mathis et al [71]

2.3.Taxonomie und Phylogenie

Der Begriff Mikrosporidien ist nicht der Taxonomie entsprechend und entstand als Balbiani 1882 die Parasiten unter diesem Begriff als separate Gruppe zusammenfasste [2]. Hiermit wird eine Gruppe obligat intrazellulärer protozoischer Parasiten bezeichnet, die zum Stamm *Microsporidia* gehören, welcher wiederum zu den Protozoen gehört. Der Stamm *Microspora* besteht aus nahezu 150 Gattungen mit mehr als 1000 Arten. Zur Klassifizierung ist die Einteilung nach Sprague (1977 vorgestellt und mehrfach überarbeitet) am weitesten verbreitet [95,96]. Die Einteilung erfolgt hauptsächlich nach ultrastrukturellen Merkmalen, wie der Größe und der Morphologie der verschiedenen Entwicklungsstadien, der Konfiguration der Kerne in den Sporen und der Anzahl der Windungen des Polfadens der Sporen. In der neuesten Überarbeitung dieser Einteilung erfolgt eine Aufteilung in Dihaplophasea und Haplophasea. Bei den Dihaplophasea ist in einigen Entwicklungsstadien ein doppelter Kern vorhanden, bei den Haplophasea zeigt sich in allen Entwicklungsstufen ein ungeteilter Kern. Neuere phylogenetische Einteilungen, die auf DNA Sequenzierungen basieren zeigen, dass die morphologischen Einteilungen den Verwandtschaftsverhältnissen der Mikrosporidien nicht gerecht werden, weshalb es in den letzten Jahren immer wieder zu Um- und Reklassifizierungen kam. Zum Beispiel die Umbenennung von *Nosema algerae* in *Anncaliia algerae* nov. comb. anhand von *ssrDNA* Sequenzierung [44]. Mikrosporidien sind kleine unizelluläre Parasiten. Aufgrund ihres Zellkerns mit Kernhülle, eines intrazytoplasmatischen Membransystems und der Chromosomenteilung durch mitotische Spindeln werden sie zu den Eukarionten gezählt. Durch das Fehlen von echten Mitochondrien, Peroxisomen, eines Golgi-Apparates, eukariotischer ribosomaler Charakteristika und der rRNA von prokariotischer Größe wurden Mikrosporidien lange Zeit für phylogenetisch sehr alte und unterentwickelte Organismen gehalten [102]. Man ging davon aus, dass sie sich von der Hauptevolutionslinie separiert hatten bevor die Symbiose mit Mitochondrien stattgefunden hatte. Molekularbiologische Untersuchungen von alpha- und

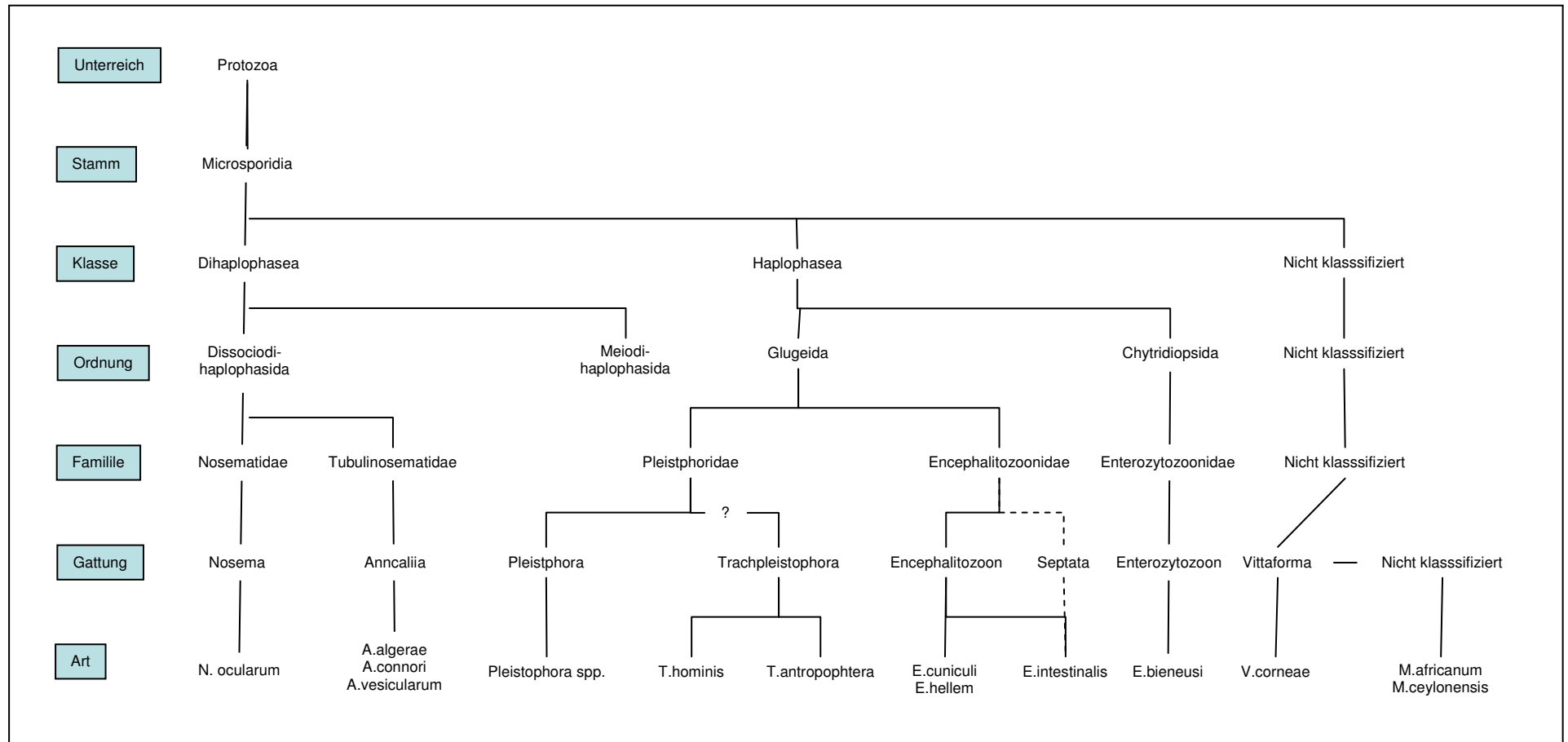


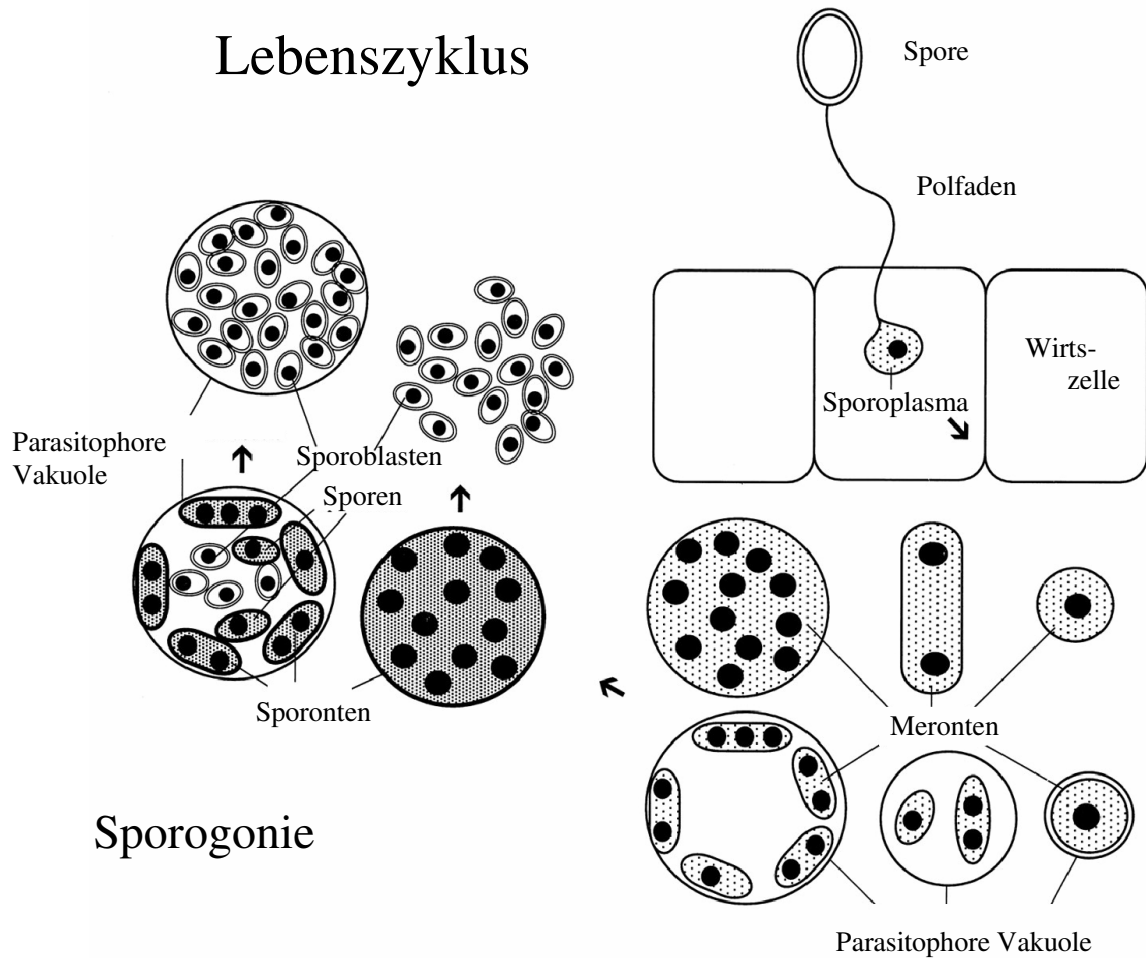
Abb. 1: Stammbaum humanpathogener Spezies nach [38,44,95,96] (Grundlage ist das revidierte Schema nach Sprague et al.); M. = Microsporidium

beta- Tubulin Sequenzen sprachen jedoch für eine nahe Verwandtschaft von Mikrosporidien zu Pilzen [7,27,56]. Weiterhin konnten in einigen Mikrosporidien Gensequenzen für das Hitzeschockprotein HSP 70 nachgewiesen werden, was ein mitochondriales Protein ist [7,49,55]. Dies spricht dafür, dass im Laufe der Evolution ein Abstoßen der fehlenden Zellorganellen zur Spezialisierung des parasitischen Lebensstils dieser Organismen beigetragen hat [58].

2.4. Morphologie und Entwicklungszyklus

Der Entwicklungszyklus ist in drei Stadien aufgeteilt. Außerhalb der Wirtszelle existieren die Mikrosporidien nur in Form von infektiösen Sporen. Mittels eines speziellen Auswurfapparates wird der infektiöse Inhalt in das Zytoplasma der Wirtszelle eingebracht. Nachdem der Inhalt der Spore in die Wirtszelle gelangt ist, wird die zweite proliferative, vegetative Phase als Merogonie bezeichnet. In der dritten Phase werden intrazellulär durch Sporogonien die Sporen gebildet. Merogonien und Sporogonien können gleichzeitig in einer multipel infizierten Wirtszelle nebeneinander vorliegen [102]. Bei menschlichen Mikrosporidieninfektionen wird der gesamte Entwicklungszyklus ohne Zwischenwirt oder Vektorübertragung abgeschlossen [7,102].

Lebenszyklus



Merogonie

Abb. 2: Diagramm eines repräsentativen Lebenszyklus einer Mikrosporidienspore nach Franzen et al. [38]
(Die Stadien der Merogonie und Sporogonie unterscheiden sich innerhalb der verschiedenen Arten)

2.4.1. Die Spore

Die Spore ist zuständig für die Übertragung infektiösen Materials von einer Wirtszelle zur nächsten, bzw. zum nächsten Wirt. Die Sporen sind zwischen 1 und 20 µm lang. Arten die Säugetiere infizieren sind für gewöhnlich relativ klein mit einem Durchmesser von 1-3 µm. Die Wand der Spore besteht aus drei Schichten: der elektronendichten proteinreichen Exospore, der elektronentransparenten chitinhaltigen Endospore und einer Plasmamembran. Die Plasmamembran umschließt den Kern (bei manchen Arten auch zwei Kerne), die hintere Vakuole, einen Auswurfapparat, der aus dem gewundenen Polfaden und einer Verankerungsplatte besteht, ein komplexes Membransystem (lamellärer Polaroplast), das den

geraden Abschnitt des Polfadens umgibt, zusätzlich raues endoplasmatisches Retikulum und freie Ribosomen. Die Anzahl und Anordnung der Polfadenwindungen variiert innerhalb der unterschiedlichen Arten. Bei den Arten *Enterocytozoon*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora* und *Encephalitozoon* findet sich ein Zellkern, wohingegen die Arten *Nosema*, *Vittaforma* und *Thelohanea* einen doppelten Kern ausbilden, der als Einheit fungiert [4,7,38,102].

Durch diesen Aufbau zeigten die Sporen in Versuchen eine enorme Widerstandsfähigkeit gegenüber äußeren Einflüssen wie Temperatur- und pH-Schwankungen [63,69].

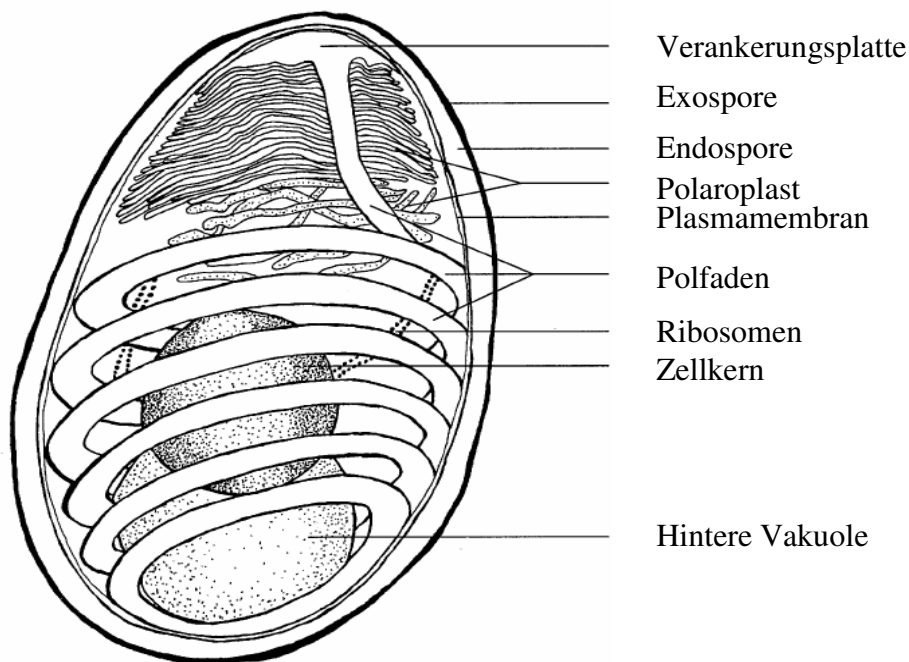


Abb. 3: Schema einer Mikrosporidienspore [37]

2.4.2. Infektion der Wirtszelle

Die Infektionsmethode der Parasiten ist einzigartig. Unter geeigneten Bedingungen wird der Polfaden aus der Spore geschleudert um das infektiöse Sporoplasma in die Wirtszelle einzubringen. Bestimmte Stimuli, die von Art zu Art variieren führen zu einem unverzüglichen Auflösen des Sporoblasten-Kompartiments und Eindringen von Wasser, was zu einem enormen Anstieg des osmotischen Drucks innerhalb der Spore und zur Ausdehnung der posterioren Vakuole führt, die das Herausschleudern des Polfadens und des Sporoplasmas anstößt. Der entfaltete Polfaden kann Längen von 50 -500 μm erreichen. Die Spitze des Polfadens übertrifft im Kulturmedium Geschwindigkeiten von 100 $\mu\text{m s}^{-1}$ [46].

Wie der Polfaden die Wirtszellmembran penetriert und welche Stimuli das Herausschleudern initiieren ist nicht gänzlich geklärt. Anfänglich ging man davon aus, dass der Polfaden die Wirtszellmembran wie eine Nadel durchstößt. Franzen et al. konnte diesen Vorgang via Doppelimmunfluoreszenzfärbung lichtmikroskopisch festhalten [33,36] (Abb.5). In weiteren Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass der Polfaden auch durch Phagozytose in die Zellen aufgenommen werden kann. Ebenso konnte gezeigt werden, dass ganze Sporen durch Endozytose aufgenommen werden. Diese müssen Ihren infektiösen Inhalt aus dem Endosom ins Zytoplasma der Wirtszelle befördern, um den Reproduktionszyklus einzuleiten, bevor eine Verdauung durch Lysosomen stattfindet [4,31,34,70].

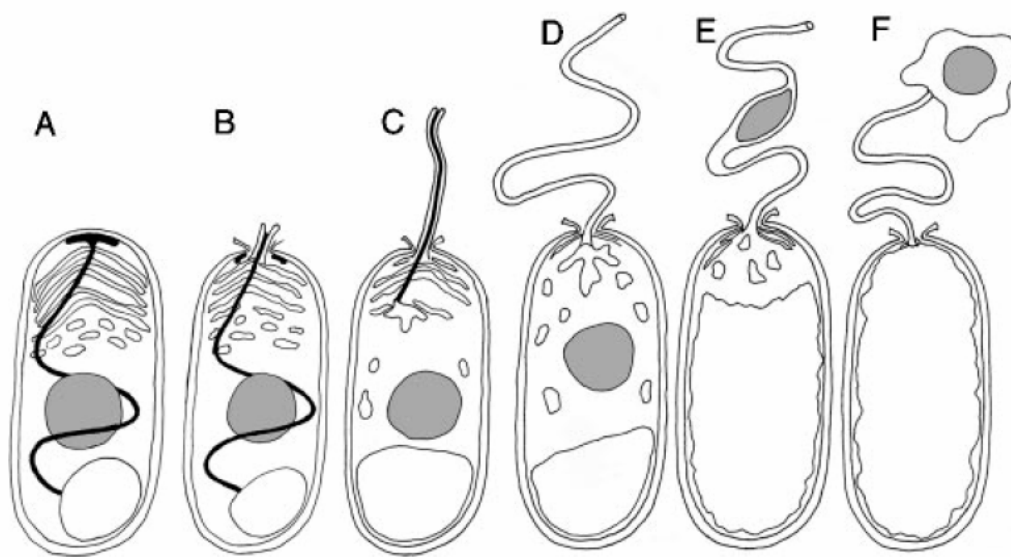


Abb. 4 : (A-F) Aktivierung einer Spore, Anschwellen von Polaroblast und posteriorer Vakuole, Hinausschießen des Polfadens und Ejektion des Sporoplasmas durch den Polfaden, nach Keeling et al. [59]

2.4.3. Merogonie und Sporogonie

Die proliferative Phase des Parasiten beginnt sobald das Sporoplasma in das Zytoplasma einer geeigneten Wirtszelle gelangt ist. Die meisten Mikrosporidienarten entwickeln sich direkt im Wirtszellzytoplasma, einige (wie z.B. *Encephalitozoon* spp. und *Glugoides intestinalis*) umgeben sich jedoch mit einer parasitophoren Vakuole die mutmaßlich der Wirtszelle entstammt. In einer aktuellen Studie konnte für *E. cuniculi* nachgewiesen werden, dass die parasitophore Vakuole aus Wirtszellphospholipiden besteht. Ebenso konnten Poren in der

Vakuole nachgewiesen werden, die an den Stoffwechselprozessen der Sporen beteiligt sind [87]. Der erste Abschnitt der Proliferationsphase ist die Merogonie, in der Meronten

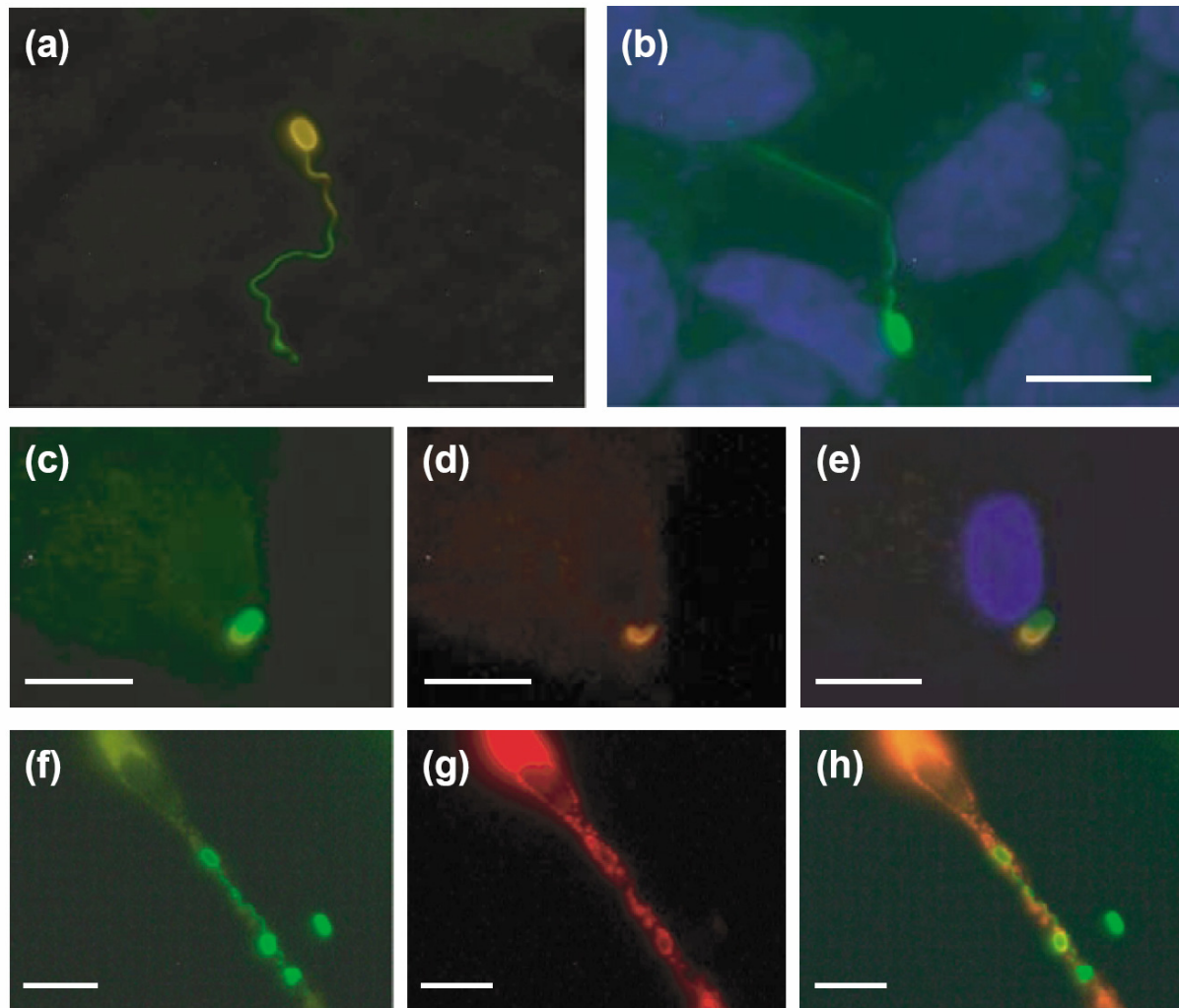


Abb. 5: Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von intrazellulären und extrazellulären *E. cuniculi* Sporen.

Rotfärbung der extrazellulären Bestandteile mit Cyanin (Cy3), Grünfärbung der intrazellulären Anteile mit Fluoreszein (FITC) und Blaufärbung der Zellkerne mit 4'6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI).

- a) Extrazelluläre Spore mit ausgeworfenem Polfaden, der in einer Zelle steckt. Die Farbe des Polfadens ändert sich von Orange (extrazellulär) in Grün (intrazellulär)
- b) Intrazelluläre Spore mit ausgeworfenem Polfaden nach Aufnahme in eine Zelle. Die Spitze des Polfadens steckt in einer anderen Zelle
- c) bis e) Ein Makrophage phagozytiert eine Spore
- f) bis h) Eine aufgenommene Spore entkommt aus einem Lysosom durch Auswurf des Polfadens. Die Spitze endet außerhalb des Lysosoms, aber innerhalb der Wirtszelle.
- f) Intrazelluläre Spore mit ausgeworfenem Polfaden
- g) Lokalisation des lysosomalen Markers LAMP-1 innerhalb der Zelle
- h) Überlagerung von f) und g)

Skala von a) bis h) entspricht 10 µm

Darstellungen mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. C. Franzen übernommen

entstehen. Meronten sind einfache rundliche, längliche oder irregulär geformte Zellen mit einem wenig differenzierten Zytoplasma umgeben von einer artspezifischen Membran. Die Vermehrung erfolgt durch zweifache oder mehrfache Teilung. Die Kernteilung erfolgt ohne Zellteilung, woraus mehrkernige plasmodienartige Formen resultieren [5,7,34,38,102].

Die zweite Phase, die Sporogonie beginnt, wenn sich die Meronten zu Sporonten weiterentwickeln. Letztere sind morphologisch durch eine dichte umgebende Hülle charakterisiert, welche später die Exospore bildet. Sporonten besitzen einen einfachen oder einen doppelten Kern, vervielfachen sich durch zweifache oder mehrfache Teilung und entwickeln sich zu Sporoblasten. Einige Sporonten entwickeln sich direkt durch Zweiteilung in Sporoblasten, andere über ein mehrkerniges plasmodienartiges Zwischenstadium. Die Sporoblasten stellen sich ovalär dar und reifen durch eine kontinuierliche Verdickung der Wand und die Synthese der Sporenorganellen zu solchen heran [5,7,34,38,102].

2.5. Charakteristika von Encephalitozoon und Vittiforma

2.5.1. Encephalitozoon spp.

Die Subspezies Encephalitozoon gehört zu den monokaryotischen Mikrosporidien. Der gesamte Entwicklungszyklus findet in einer Wirtszellvakuole statt. In der Merogonie teilen sich zwei- oder dreikernige Meronten, die an die Vakuolenmembran angeheftet sind. In der Sporogonie lösen sich die Sporonten von der Vakuolenmembran, sobald die Hülle produziert ist, die die Exospore bilden wird. Eine weitere Teilung der zwei- oder dreikernigen Sporoblasten findet im Zentrum der Vakuole statt. Die Sporen sind $2,5 \times 1,5 \mu\text{m}$ groß, von ellipsoider Form und der Polfaden weist fünf bis acht Windungen in einer Reihe auf. Die Morphologie der Sporen ist sehr ähnlich; es gibt lediglich kleine Unterschiede bezüglich der Größe und der Form. Eine genaue Unterscheidung der Sporen ist nur durch immunhistochemische Verfahren gewährleistet [7].

2.5.1.1. E. cuniculi

E. cuniculi war 1922 die erste Mikrosporidien Subspezies die bei Säugetieren gefunden wurde. Zuerst bei Hasen, im Verlauf in vielen weiteren Säugern, einschließlich dem Menschen [6,38,39,109]. Von *E. cuniculi* existieren drei unterschiedliche Erregerstämme. Typ I wurde von Hasen und Mäusen isoliert, Typ II von Mäusen und blauen Füchsen und Typ III von Hunden, Nagern, Ziegen, Schafen, Schweinen, Pferden, Füchsen und Katzen. Beim Menschen konnten bisher nur Typ I und Typ III nachgewiesen werden [15,38,92].

2.5.1.2. *E. hellem*

1991 wurde mit *E. hellem* eine neue Spezies beschrieben. Licht- und elektronenmikroskopisch sind sich *E. cuniculi* und *E. hellem* jedoch so ähnlich, dass sie nur immunhistochemisch, biochemisch und durch Nukleinsäureanalysen unterschieden werden können [6,38,39]. Dadurch sind einige Fälle mit dem Nachweis von *E. cuniculi* vor 1991 nicht klar zuzuordnen.

2.5.1.3. *E. Intestinalis*

Aufgrund morphologischer Ähnlichkeiten war *E. intestinalis* bei seiner Erstbeschreibung 1992 der Subspezies *Encephalitozoon* zugeordnet worden.

Als Besonderheit zeigt sich in der parasitophoren Vakuole dieses Parasiten eine deutliche Septierung, durch ein fibrilläres Netzwerk. Deshalb erfolgte im Verlauf eine Umklassifizierung als eigene Subspezies mit dem Namen *Septata intestinalis*. Erst im Rahmen von rRNA Sequenzierungen wurde eine Reklassifizierung in die Spezies *Encephalitozoon* vorgenommen [7,38,39,53].

2.5.2. *Vittaforma corneae*

Vittaforma corneae wurde 1990 als *Nosema corneae* erstbeschrieben. Die Isolierung erfolgte aus der Cornea eines ansonsten gesunden 45-jährigen Mannes mit einer progressiven zentralen Keratitis und 18 monatiger Krankenvorgeschichte. 1995 erfolgte aufgrund einer SSU rRNA Gensequenzierung die Umbenennung in *Vittaforma corneae* als eigene Gattung.

V. Corneae konnte als erste Mikrosporidienart in vitro kultiviert werden. Der Parasit wird zu den diplokariotischen Mikrosporidien gezählt, die sich alle in direktem Kontakt zum Wirtszellzytoplasma, ohne parasitophore Vakuole, entwickeln. Alle Entwicklungsstadien sind vom endoplasmatischen Retikulum der Wirtszelle umgeben, das sich mit dem Parasiten teilt. In der Merogonie erfolgt die Teilung von Meronten mit jeweils zwei Doppelkernen. Die Sporonten sind bereits mit der Parasitenhülle umgeben und enthalten bis zu acht Doppelkerne. Die Aufteilung in Sporoblasten geschieht durch Invagination von Plasmamembran, Parasitenhülle und endoplasmatischem Retikulum von zwei Seiten, so dass eine kettenförmige Struktur entsteht. Die Sporen messen $3,7 \times 1,0 \mu\text{m}$, sind länglich, weisen fünf bis sieben Polfadenwindungen auf und sind einzeln in endoplasmatisches Retikulum eingehüllt [5,7,38,39,91].

2.5. Epidemiologie und Übertragung

Von menschlichen Infektionen mit Mikrosporidien wurden aus der ganzen Welt berichtet; in der Mehrzahl der Fälle handelte es sich um HIV-infizierte Personen. Obwohl Mikrosporidien verbreitete Pathogene bei HIV-Infizierten in Afrika sind, ist weiterhin unklar, ob sie in tropischen und subtropischen Gebieten weiter verbreitet sind als in Europa und Nordamerika. Die weite geographische Verbreitung und die hohe Prävalenz bei HIV-Infizierten legen jedoch nahe, dass der Mensch zum natürlichen Wirtsspektrum dieser Parasiten gehört, wobei Erkrankungen fast nur bei Immunsupprimierten hervorgerufen werden [90]. Bisher ist nur in wenigen Studien die Übertragungsquelle und Art der Übertragung untersucht worden. Die Feststellung, dass Mikrosporidien ubiquitär vorkommen, legt nahe, dass es mehrere Übertragungswege und Erregerreservoirs für menschliche Infektionen gibt.

Mutmaßlich findet der Hauptanteil der Infektionen über orale Aufnahme oder Inhalation der Sporen statt. Typischerweise hängt die Infektion vom Übertragungsweg ab, sodass in erster Linie Epithelzellen des Gastrointestinal- und Respirationstraktes betroffen sind. Bei Menschen wurden im Gegensatz zu Fleischfressern wie Füchsen und Hunden bisher keine vertikalen oder transplazentalen Übertragungen beschrieben [21,23,93,100]. Encephalitozoon-Sporen können während frühen Phasen gastrointestinaler Infektionen im Stuhl nachgewiesen werden, durch Streuung werden im Verlauf auch Nieren und Respirationstrakt infiziert, wodurch später Sporen im Urin und Bronchialsekret nachgewiesen werden können [62,103]. Somit scheint eine horizontale Übertragung über fäkal-oral, oral-oral, Inhalation

kontaminierter Aerosole und Aufnahme von kontaminiertem Essen und Wasser möglich [17,76,103], unterstützt durch homosexuelle Praktiken, intravenösen Drogenabusus, Exposition zu Wasser in Schwimmbädern oder berufsbedingter Kontakt mit Wasser [13,17,57]. Direkte zoonotische Übertragung konnte bisher nur in einem Fall beschrieben werden, bei einem Kind, das nach der Exposition zu *E. cuniculi* infizierten Hundewelpen serokonvertierte [73]. Da einige Mikrosporidien wenig wirtsspezifisch sind, ist eine Kontamination von Wasser durch Urin und Stuhl von infizierten Tieren möglich und somit eine Übertragung auf den Menschen denkbar. In einer Studie konnte zusätzlich eine erhöhte Infektionsrate mit Mikrosporidien bei HIV infizierten Individuen nachgewiesen werden, die mindestens einmal pro Monat nicht ganz durchgegartes Rindfleisch zu sich nahmen [57]. Die Sporen sind widerstandsfähig gegen Umwelteinflüsse und überleben deshalb längere Zeit im Wasser und entgehen durch ihre Größe den meisten Filtersystemen; die Infektionsdosis ist jedoch relativ niedrig [37]. Aus den unterschiedlichsten Wasserquellen konnten bereits mehrere Mikrosporidienarten, die Menschen infizieren, isoliert werden. Bezüglich der Übertragungsmöglichkeit durch Wasser wurden Mikrosporidien vom National Institute of Health und dem Center for Disease Control and Prevention als pathogene Keime der Kategorie B eingestuft [78].

2.6. Klinische Manifestation

Mikrosporidien können hochpathogene Erreger sein, die ein breites Spektrum von Symptomen hervorrufen können, hauptsächlich bei immunsupprimierten Individuen. Innerhalb der letzten 20 Jahre wurden die meisten Mikrosporidien-assoziierten Infektionen bei HIV infizierten Patienten beschrieben. Wichtiger als die humorale Abwehr scheint die zelluläre Abwehr bei Mikrosporidieninfektionen zu sein. AIDS-Patienten mit weniger als 100 CD4 + T-Zellen/ μ l entwickelten dabei oft anhaltende Durchfälle begleitet von Fieber, Appetitverlust und Gewichtsabnahme [28,35,43]. Diese Patienten entwickelten nach Streuung der Infektion Enzephalitiden, Sinusitiden, Rhinitiden, Nephritiden, Hepatitiden, Myositiden, Keratitiden, Pneumonien oder Peritonitiden [12,62,103]. Organtransplantierte Patienten, die unter immunsuppressiver Therapie mit *Encephalitozoon* spp. infiziert wurden, litten an Müdigkeit, Fieber, Erbrechen und Durchfällen [52,62]. Unlängst konnten jedoch auch Mikrosporidien als Ursache pulmonaler Infektionen bei knochenmarkstransplantierten Patienten nachgewiesen werden [81,97]. Bei Immunkompetenten wurden bisher nur Fälle

selbstlimitierender Diarrhoe mit einer Dauer von 2- 3 Wochen [77,79] und korneale Infektionen berichtet [30]. Typische Reaktionen sind Hypertrophie der infizierten Zellen und Gewebe; eine inflammatorische Antwort erfolgt erst nach Lyse der Zellen und Freisetzung der Sporen. Diese besteht aus einer diffusen zellulären Infiltration, aus Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen und führt zur Granulombildung. Bei Immunsupprimierten fällt diese Antwort meist deutlich geringer aus [7].

Encephalitozoon cuniculi

E. cuniculi verursacht bei Immunsupprimierten breit streuende Infektionen mit Beteiligung nahezu aller Organsysteme. Die klinischen Manifestationen variieren von asysmptomatischen Fällen bis hin zu schweren Erkrankungen [45,74,80].

Encephalitozoon intestinalis

E. intestinalis verursacht hauptsächlich Enteritiden mit Durchfall, Gewichtsverlust und Malabsorption [43,64,74,82]. Daneben infizieren diese Parasiten oft den Gallentrakt und die Gallenblase und verursachen Cholangitiden und Cholezystitiden [105]. Die Streuung der Infektion erfolgt über die Epithelzellen in die Lamina propria und führt im weiteren Verlauf zu schweren Harnwegs- und Niereninfekten [26,40,80]. Bei einer unbehandelten Dünndarminfektion konnte sogar eine Perforation mit der Entwicklung einer Peritonitis beobachtet werden [94]. Disseminierte Infektionen beginnen im Gastrointestinaltrakt und den Gallenwegen und dehnen sich auf Nieren, Augen, Nasennebenhöhlen und manchmal den Respirationstrakt aus [38].

Encephalitozoon hellem

Dieser Parasit befällt hauptsächlich die Keratokonjunktiven, Harnwege, Nasennebenhöhlen und das Bronchialsystem [38].

Vittaforma corneae

V. corneae Infektionen beim immunkompetenten Menschen betreffen bisher nur das Auge [30,86]. In einem Fall konnte bei einem HIV-Patienten in Afrika ein Harnwegsinfekt nachgewiesen werden mit Beteiligung von V. corneae [16].

Infektionen	E. cuniculi	E. intestinalis	E. hellem	V. corneae
Encephalitis	<input checked="" type="checkbox"/>			
Keratokonjunktivitis / Keratitis	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Sinusitis / Rhinitis	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Pneumonie / Bronchiolitis			<input checked="" type="checkbox"/>	
Peritonitis	<input checked="" type="checkbox"/>			
Hepatitis	<input checked="" type="checkbox"/>			
Cholangitis / Cholezystitis		<input checked="" type="checkbox"/>		
Enteritis		<input checked="" type="checkbox"/>		
Nephritis		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Harnwegsinfekte	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Prostataabszess			<input checked="" type="checkbox"/>	
Disseminierte Infektionen	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	

Tabelle 2: Beim Menschen bisher nachgewiesene Infektionen, verursacht durch die vier untersuchten Mikrosporidienarten im Überblick; E. = Encephalitozoon, V. = Vittaforma; Literaturangaben s.o.

2.7.Diagnostik

Die Transmissionselektronenmikroskopie war anfangs Standard der Diagnostik und ist immer noch ein wichtiges Mittel, um die ultrastrukturelle Morphologie der Mikrosporidien zu erfassen und in Kombination mit molekularbiologischen Verfahren die taxonomische Einteilung zu verbessern [44,66]. Für die Routinediagnostik ist dieses Verfahren jedoch zu teuer und zu zeitaufwendig. In der Folge wurden histochemische Methoden entwickelt, wodurch Mikrosporidien effizienter in Flüssigkeiten wie Faeces, Urin und Mucus und in Geweben nachzuweisen waren [48,103]. Diese Methoden beinhalteten die lichtmikroskopische Darstellung mit Fluoreszenzverstärkern wie z.B. Calcofluor white, Uvitex 2B und Fungifluor, die die chitinhaltige Sporenwand anfärben, zusätzlich eine

modifizierte Trichromfärbung, teilweise in Kombination mit Gramfärbung und die Warthin-Starry- Silberfärbung [48]. Durch die Entwicklung von Immunfluoreszenzfärbung mit monoklonalen Antikörpern konnten vereinfachte Nachweise von Mikrosporidien erfolgen. Diese Methode ist jedoch für klinische Belange limitiert durch erhebliche Unterschiede in der Spezifität, je nach verwendetem Antigen und durch die limitierte oder fehlende Antikörperproduktion bei Immunsupprimierten. PCR-basierende Methoden, die mikrosporidientypische rDNA-Primer verwenden, werden zu Forschungszwecken eingesetzt, haben sich allerdings in der Routinediagnostik noch nicht durchgesetzt. Ein erweiterter Ansatz ist die Anwendung von Oligonukleotidchip-Systems, womit die drei humanpathogenen *Encephalitozoon*-Spezies und *Enterocytozoon bieneusi* gleichzeitig nachgewiesen und differenziert werden können [99]. Seit zunehmend Mikrosporidieninfektionen bei immunkompetenten Individuen nachgewiesen werden, steigen die Anforderungen an serologische Methoden, die die ganzen Organismen, rekombinante Polfadenproteine und Sporenwandproteine als Antigene verwenden, speziell in Fällen, in denen Mikrosporidien nicht kultiviert werden können [83,84,98,108]. Dies ist auch wichtig um subklinische Infektionen bei Individuen zu diagnostizieren, die als Überträger für Risikopatienten in Frage kommen, oder für Individuen, die durch eine Reaktivierung der Infektion selbst gefährdet werden könnten.

Die Anzahl der Infektionen mit Mikrosporidien wird sicher auch weiterhin unterschätzt. Dies liegt daran, dass die Organismen sehr klein sind und leicht übersehen werden, dass die Infektionen meist unspezifische Symptome hervorrufen, die die Mikrosporidien nicht in die Differentialdiagnose mit einschließen und, dass Mikrosporidien in den meisten Laboren nicht unter die mikrobiologische Routinediagnostik fallen.

2.8. Therapie

Anfänglich wurde in invitro-Modellen die Effektivität verschiedener Medikamente gegen *E. cuniculi*, *E. hellem* und *E. intestinalis* getestet. Das Wachstum von *E. cuniculi* in Zellkulturen konnte durch Albendazol, Fumagilin, 5-Fluorurazil, Sparfloxazin, Oxibendazol und Propamidin-Isethionat gehemmt werden. Chloroquin, Perfloxazin, Azithromycin, Rifabutin und Thiabendazol erwiesen sich unter hohen Konzentrationen teilweise effektiv. Die Substanzen Arprinozit, Metronidazol, Minozyclin, Doxycyclin und Difluoromethylornithin zeigten erst eine Wirkung, wenn bereits toxische Effekte für die

Zellen eintraten. Pyrimethamin, Piritrexim, Sulfonamide, Paronomycin, Roxitromycin, Atovaquon, Flucytosin, Toltrazuril, Ronidazol und Ganciclovir erwiesen sich als ineffektiv. Die Sporenentwicklung von *E. hellem* und *E. intestinalis* wurde durch Nifedipin und Metronidazol gehemmt. Die Vermehrung von *E. hellem* wurde zusätzlich von Cytochalasin D, Demecolcin und Itraconazol gehemmt. Basierend auf diesen in vitro Studien wurden mehrere Substanzen verwendet, um Mikrosporidien-Infektion bei Menschen zu behandeln [3,25,32,38,54,67,68,104].

Aktuell finden vor allem 2 Substanzen in der Behandlung von Mikrosporidieninfektionen beim Menschen Verwendung. Zum einen Albendazol, ein Benzimidazol, das die Polymerisation von Tubulin hemmt. Es weist gute Effektivität gegen Encephalitozoonspezies auf, jedoch nur eingeschränkt gegen *E. bienersi* [9,75]. Zum zweiten ist Fumagilin, eine von *Aspergillus fumigatus* produzierte antibiotische Substanz, hochwirksam bei der topischen Anwendung gegen *Encephalitozoon* spp., z.B. bei Keratokonjunktividen [8,9]. Eine systemische Anwendung von Fumagilin erwies sich als hochwirksam gegen *E. bienersi*, verursachte aber bei einigen Patienten Neutropenie und Thrombozytopenie [75]. TNP-470, ein halbsynthetisches Fumagilinanalogon, zeigte in der Zellkultur und bei athymischen Mäusen hohe Wirksamkeit gegen die Encephalitozoon-Spezies *E. intestinalis*, *E. hellem*, *E. cuniculi* und gegen *Vittaforma corneae*. Diese Substanz zeigte eine weitaus geringere Toxizität als Fumagilin [11,24]. Eine konsequente antiretrovirale Therapie bei HIV-Patienten und die damit korrelierende Erhöhung der CD 4+-T-Zellen hat in den letzten Jahren zu einer Reduktion vieler opportunistischen Infektionen einschließlich Mikrosporidien geführt [9]. Neuere Therapieansätze zielen ab auf mikrosporidische Polyamine (z.B. durch Polyaminanaloga), auf Methioninaminopeptidase 2 (z.B. Fumagilin-Analoga), auf Chitin (z.B. Nikkomycin) und Topoisomerase (z.B. Fluorchinolone) [1,19,22,24].

3. Material und Methoden

3.1. Zellkultur

Für die Untersuchungen wurden fünf verschiedene etablierte adhärent wachsende Zelllinien in Monolayer-Kultur und eine in Suspension wachsende Zelllinie kultiviert.

3.1.1. Zelllinien

MRC-5 (Medical Research Council 5) sind adhärent wachsende menschliche Lungenfibroblasten und stammen vom Lungengewebe eines 14 Wochen alten Fetus.

Bei Vero-Zellen handelt es sich um eine etablierte Zelllinie, die aus normalen Nierenzellen von Grünen Meerkatzen (African Green Monkey) gewonnen wurde. Sie wachsen adhärent und haben eine fibroblastenähnliche Morphologie.

HT-29-Zellen entstammen dem Primärtumor eines Adenokarzinoms des Kolons einer 44-jährigen kaukasischen Frau im Jahre 1964. Sie wachsen ebenfalls adhärent.

A-549-Zellen entstammen einem Bronchialkarzinom, das einem 58-jährigen kaukasischen Mann 1972 entfernt wurde.

HCT-8-Zellen entstammen einem ileocöcalem Adenokarzinom eines 67-jährigen Mannes und sind identisch mit der HRT-18-Zelllinie.

THP-1-Zellen entstammen dem peripheren Blut eines 1-jährigen männlichen Kindes mit akuter monozytischer Leukämie. THP-1-Zellen haben Fc und C3b Rezeptoren, zytoplasmatische Immunglobuline und produzieren IL-1. Sie zeigen eine vermehrte CO₂-Produktion bei Phagozytose und können zu makrophagen-ähnlichen Zellen ausdifferenziert werden.

3.1.2. Methoden der Zellkultivierung

Die Zellen wurden in einem sterilen Standardbrutschrank bei 37 °C in gesättigter H₂O-Athmosphäre und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Als Kulturgefäße kamen sterile Kulturflaschen mit einer Kulturfläche von 5 oder 25 cm² zum Einsatz.

Die Zelllinien MRC-5, Vero, AT-29 und A-549 wurden unter Verwendung von Minimal Essential Medium (MEM) kultiviert. Dem Medium wurden 10 % FKS (fetales Kälberserum), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und 0,25 mg/ml Amphotericin B (alles von GIBKO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt.

Die Zelllinie HCT-8 wurde mit 1640 RPMI (Roswell Park Memorial Institute) Medium mit L-Glutamin, mit 2,0 g/NaHCO₃ (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) kultiviert. Ergänzt wurde das Medium mit 10 % FKS, 100 µl/ml Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin,

100 mg/ml Streptomycin und 0,25 mg/ml Amphotericin B (alles von GIBKO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

FKS enthält essentielle Wachstumsfaktoren, Salze und Spurenelemente; L-Glutamin und Natriumpyruvat sind essentielle Nahrungsbestandteile. Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B konnte den Medien zum Schutz vor Verunreinigungen durch Bakterien oder Pilze zugefügt werden, da das Wachstum der Parasiten nicht durch diese Medikamente beeinträchtigt wird.

Die Zelllinie THP-1 wurde auch mit 1640 RPMI Medium (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) mit den oben erwähnten Zusätzen kultiviert. Für diese Zelllinie wurden jedoch außerdem 1% nicht essentielle Aminosäuren und 1µl/ml β-Mercapto-Ethanol hinzugefügt (GIBKO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

Das Kulturmedium wurde jeden zweiten Tag unter sterilen Bedingungen gewechselt. Die Medien wurden bei 4 °C gelagert und kurz vor Verwendung auf 37 °C erwärmt.

Das Passagieren der Zellen erfolgte je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinien nach vier bis sieben Tagen.

Die Konfluenz der adhärent wachsenden Zelllinien wurde durch ein Phasenkontrastmikroskop optisch kontrolliert. Zum Passagieren wurde das Medium abpipetiert, verworfen und der Zellrasen zweimal mit HBSS ohne Ca^{++} und Mg^{++} (GIBKO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gespült und anschließend ca. 3-5 min bei 37 °C mit 3 ml Trypsin 0,05 % und 0,53 mM EDTA in HBSS ohne Ca^{++} und Mg^{++} inkubiert. Das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurde mit einem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Die abgelösten Zellen wurden zum Abstoppen der proteolytischen Wirkung des Trypsins mit FKS-haltigem Kulturmedium aufgenommen und in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Das im Medium enthaltene FKS stoppt hierbei die Aktivität des Trypsins. Die Zellen wurden bei 200 G für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die im Pellet enthaltenen Zellen in frischem Kulturmedium durch Auf- und Absaugen mit einer Pipette resuspendiert. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:2 bis 1:3 in neue Kulturflaschen überführt und weiterkultiviert. Die Dichte der in Suspension kultivierten Zelllinie THP-1 wurde anhand einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Zum Passagieren wurden die Zellen mitsamt Kulturmedium aus der Kulturflasche gespült und bei 200 G für 5 Minuten zentrifugiert. Wie bei den adhären Zellen wurde dann der Überstand abgesaugt, das Pellet in frischem Kulturmedium resuspendiert, in neue Kulturflaschen überführt und die Zellen weiterkultiviert.

3.2. Mikrosporidien

3.2.1. Gewinnung der Sporen

E. cuniculi, *E. hellem*, *E. intestinalis* und *V. corneae* wurden in MRC-5 Zellen und Vero Zellen unter den oben genannten Bedingungen in 25 cm² Kulturflaschen kultiviert.

Das Kulturmedium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Die mit dem Kulturmedium entnommenen Sporen wurden bei 1500 G für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit den Sporen wurde mit 0,25% Natriumdodecylsulfat in PBS und danach ein weiteres Mal in PBS gewaschen. Die Sporen wurden gereinigt und von Zelltrümmern befreit indem sie auf 50% Percoll (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) geschichtet und bei 500 G für 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert wurden. Danach wurden sie noch einmal in PBS gewaschen. Schließlich wurden die Sporen mit Tryptanblau angefärbt, in einer Neubauer Zählkammer gezählt und mit genügend PBS verdünnt um eine Konzentration von 10⁷ bis 10⁸ Sporen/ml zu erreichen. Die Lagerung der Sporen erfolgte bei 4°C.

3.3. Herstellung der polyklonalen Antiseren

Die Antiseren gegen *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis* und *V. corneae* wurden in weiblichen New Zealand White Rabbits (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) produziert. Vor der Beimpfung mit den Sporen wies keiner der Hasen im indirekten Immunfluoreszenztest Antikörper gegen die verwendeten Parasitenarten auf. Die Sporen wurden vor der Verwendung zur Inaktivierung für 10 Minuten auf 60° C erhitzt und 15 Minuten lang im 60° C heißen Wasserbad mit Ultraschall der Wellenlänge 35 kHz behandelt (Sonorex RK100H, Bandelin, Deutschland). Acht Hasen (je zwei für jede Art Mikrosporidien) wurde zum Zeitpunkt null und nach einem Monat 1,0 ml einer Suspension mit einer Konzentration von 10⁸ Sporen von *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis* oder *V. corneae* subcutan injiziert. Die erste Injektion erfolgte mit „complete Freud’s Adjuvant“, die zweite mit „incomplete Freud’s Adjuvant“. Jeweils nach einem, zwei, drei und vier Monaten wurden Blutproben aus den randständigen Ohrvenen entnommen und im indirekten

Immunfluoreszenztest auf Antikörper gegen *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis* und *V. corneae* überprüft.

3.4. Infektion der Zelle

Sämtliche Zellen wurden unter oben erwähnten Bedingungen in 5 cm² Zellkulturflaschen angezüchtet. Zum Zeitpunkt der Infektion waren die adhärent wachsenden Zellen (MRC-5, Vero, AT-29, HCT-8 und A-549) nahezu konfluent. Der Zeitpunkt zur Infektion der THP-1 Zellen, als einzige in Suspension wachsende Zellart, wurde anhand ihrer Konzentration mit einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Der Sollwert betrug mindestens 1 x 10⁶ Zellen/ml. Die Konzentration der Sporen, ebenfalls in einer Zählkammer ermittelt, betrug 2,6 x 10⁷/ml. Für jede Messreihe wurden sechs 5 cm² Kulturflaschen einer Zellsorte verwendet. Fünf davon wurden zum Zeitpunkt null mit einer Parasitenart infiziert und im Brutschrank in gesättigter H₂O-Athmosphäre, bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Die sechste Flasche wurde als Kontrollprobe verwendet.

3.5. Immunfluoreszenzfärbung der intrazellulären Parasiten

Nach 1, 2, 4, 6 und 24 Stunden wurde bei den adhärent wachsenden Zellen das Medium verworfen und der Zellrasen zweimal mit HBSS ohne Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺ (GIBKO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gewaschen um Zelltrümmer und nicht aufgenommene Sporen zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit je 3 ml Trypsin 0,05% und 0,53 mM EDTA in HBSS ohne Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺ inkubiert, unter mikroskopischer Kontrolle aus den Flaschen gelöst und mit dem zugehörigen Medium aus den Kulturflaschen gespült. Die Zellen wurden bei 500 G für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abpipetiert und das Pellet mit 4% Paraformaldehyd in Ca⁺⁺- und Mg⁺⁺- freiem PBS (pH 7,4) resuspendiert und 15 min lang fixiert.

Hierauf wurden die Zellen wieder bei 500 G für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, die Fixationslösung verworfen und das Pellet in 1xPBS resuspendiert. Die Zwischenlagerung der fixierten Zellen erfolgte bei 4 °C.

Die THP-1 Zellen konnten als Suspensionszellen ohne Trypsinbehandlung direkt mit ihrem Medium aus den Kulturflaschen gespült werden. Das weitere Verfahren erfolgte wie oben beschrieben.

Die fixierten Zellen wurden in 50 mM NH_4Cl gewaschen bei 500 G für 30 Minuten mit 1% BSA geblockt und danach wurde die Zellmembran durch eine 15minütige Inkubation mit 0,1 % Saponin (Sigma-Aldrich CO, Saint Luis, USA) permeabilisiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem polyklonalen Hasenantikörper gegen die jeweilige Parasitensorte 15 Minuten lang inkubiert. Zur Verdünnung der Antikörper auf eine Konzentration von 1:200 wurde 1% BSA und 0,1% Saponin in 1x PBS verwendet. Die Proben wurden nach einem weiteren Waschgang (5 Minuten bei 500 G mit 1% BSA und 0,1% Saponin in 1x PBS) mit dem FITC konjugierten F(ab')₂ Fragment gegen den Ig Abschnitt des Hasenantikörpers (Alexa Fluor 488) in einer Konzentration von 3,5 µg/ml 15 Minuten lang inkubiert. Das Fluoreszenzfragment wurde ebenfalls mit 1% BSA und 0,1% Saponin in 1x PBS verdünnt. Die nochmals gewaschenen Zellen wurden bis zur Messung in 1x PBS, dunkel und auf Eis gelagert. Sämtliche Inkubationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.6. Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine Methode zur gleichzeitigen Analyse der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Einzelzellen in Suspension. Das Durchflusszytometer setzt sich aus einem strömungsmechanischen und einem optischen System zusammen.

3.6.1. Prinzip

3.6.1.1. Das strömungsmechanische Prinzip

Die zu untersuchende Zellsuspension wird über eine Kapillare durch Unterdruck in eine Düse geleitet, wo sie von einem Mantelstrom (isotonische Kochsalzlösung) umgeben wird. Durch unterschiedliche Druckverhältnisse wird die Zellsuspension in der Mitte des Mantelstroms so beschleunigt, dass Verwirbelungen vermieden werden (laminarer Strom), Zellaggregate sich auflösen und die Zellen perlschnurartig aneinandergereiht nacheinander den Laserstrahl in

einer Durchflussküvette aus Quarzglas passieren. Durch dieses Prinzip der Hydrodynamischen Fokussierung ist die Detektion von bis zu 1000 Events / Sekunde möglich.

3.6.1.2. Das optische System

Als Anregungsquelle dient in dem für die Versuche verwendeten FACScan ein luftgekühlter Argon-Ionen-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm, 15 mV Leistung und einem auf dem Zellstrom fokussierten Spot von 20x50 µm.

Jede einzelne Zelle streut entsprechend ihrer Größe, der Struktur ihrer Zellmembran und der Art ihrer intrazellulären Bestandteile den auftreffenden Laserstrahl in spezifischer Weise.

Der in Richtung des Laserstrahls gestreute Anteil des Lichtes, das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) wird von einer Photodiode detektiert; es korreliert mit der Größe der Zelle.

Ein Teil des Laserstrahls wird durch die Zellen senkrecht abgelenkt und gestreut, dieses Seitwärtsstreulicht (sideward scatter, SSC) ist abhängig von der Granularität der Zellen.

Für die Detektion wird hier ein empfindlicherer Photomultiplier (PMT) eingesetzt.

Auch das durch den 488 nm Laser angeregte Fluoreszenzsignal wird im 90°-Winkel erfasst. Entsprechende Strahlenleiter und Filter teilen es abhängig von seiner Wellenlänge vom 488 nm Streulicht ab und lenken es auf den entsprechenden der drei Detektoren. Jeder dieser Detektoren ordnet einem Impuls nach Digitalisierung und einstellbarer Verstärkung entsprechend seiner Intensität einen von 1024 Kanälen zu.

3.6.2. Geräteeinstellung

Die Geräteeinstellungen basieren auf Vorversuchen und der Veröffentlichung von Franzen et al., über die durchflusszytometrische Quantifizierung von Mikrosporidien in verschiedenen Zelllinien [41].

Protokoll für THP 1 Zellen

Signal	Volt	Verstärkung
FS	0	1,0
SS	0	1,0
FL1	462	1,0

FL2	825	1,0
FL3	1230	1,0
FL4	1387	1,0

Protokoll für die anderen Zelllinien

Signal	Volt	Verstärkung
FS	0	2,0
SS	0	1,0
FL1	527	1,0
FL2	825	1,0
FL3	1230	1,0
FL4	1387	1,0

3.7. Quantifizierung der Sporen

Die graphische Darstellung der Fluoreszenzzunahme nach Sporenaufnahme erfolgte anhand von Punktwolken mit logarithmischer Auftragung.

3.7.1. Auswertung Punktwolke

Die Auswertung der Punktwolken erfolgte mit WinMDI Version 2.8 und Expo32 Version 1.2. Es wurden 20000 Ereignisse angezeigt. Die Darstellung der Punktwolke erfolgte durch logarithmische Auftragung des sidescatter-Strahls auf der Y-Achse, auf der X-Achse erfolgte die logarithmische Auftragung der Fluoreszenz. Bei Zunahme der Fluoreszenz wurde eine Verlagerung der Punktwolke in Richtung der X-Achse erwartet. In der Leerprobe wurde die erste Region um die Punktwolke gelegt, wobei mindestens 95 % der Ereignisse eingeschlossen waren. Direkt angrenzend wurde eine zweite Region angelegt. Diese Regionen wurden für die sechs Proben einer Messreihe übernommen. In der statistischen Auswertung wurde die Prozentzahl der Ereignisse erfasst, die durch Fluoreszenzzunahme von der ersten in die zweite Region abwanderten.

Für jede unterschiedliche Kombination aus Sporen und Zellen wurden je drei Messreihen angesetzt. Hieraus wurden für jeden Zeitpunkt Mittelwerte mit Standardabweichungen errechnet. Um signifikante Unterschiede der Sporenaufnahmen in die Zellen zu ermitteln erfolgte eine two-way of Variance Analyse. P-Intervalle $< 0,05$ galten als signifikant. Zur

optischen Darstellung im Zeitverlauf erfolgte eine Darstellung der Mittelwerte in verschiedenen Kombinationen in Diagrammen.

Die Computerauswertung wurde wie oben dargestellt mit Excel 2003 und SPSS 9.0 durchgeführt.

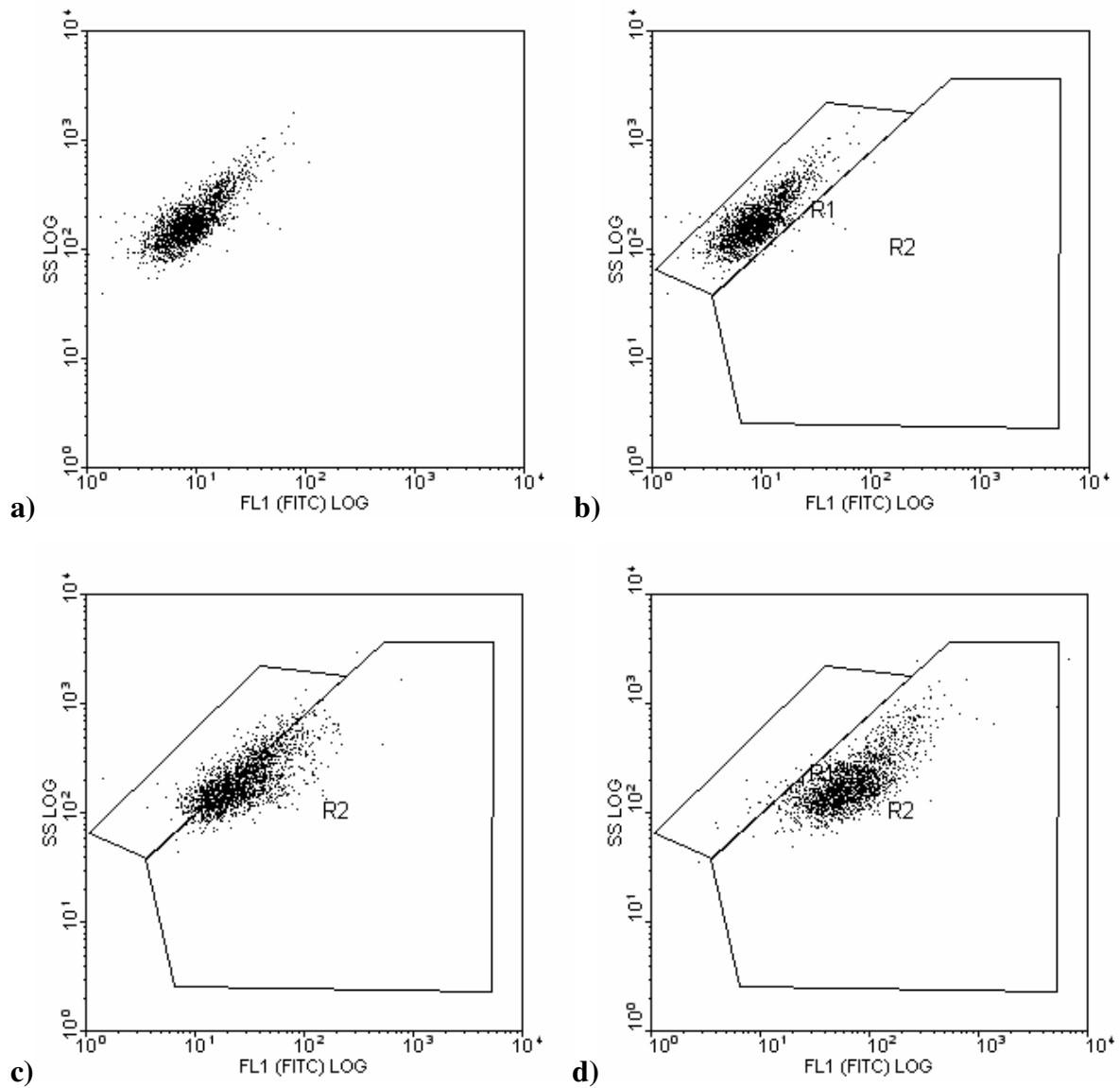


Abb. 6: Punktwolken: a) Leerpobe, b) Leerpobe mit Eintragung der Regionen, c) nach 6h, d) nach 24h; logarithmische Auftragung: auf der y-Achse Sidescatter-Strahl, auf der x-Achse Zunahme der Fluoreszenz; R1 = Region 1, R2 = Region 2

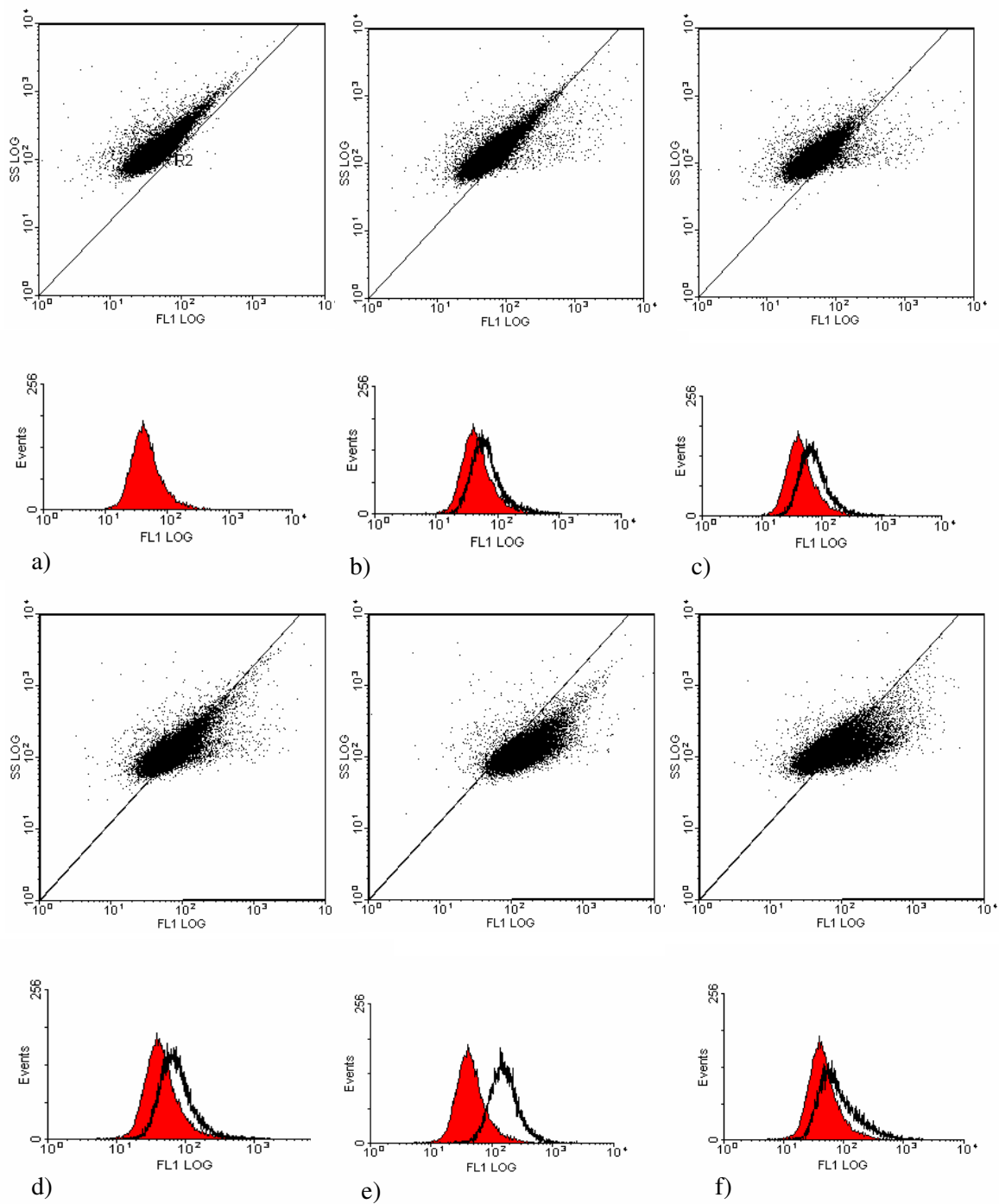


Abb. 7: Darstellung einer Messreihe mit THP-1 Zellen inkubiert mit *E. cuniculi*; unter dem Dot plot [logarithmische Auftragung des Side scatter Strahls (y-Achse) gegen die Fluoreszenz (x-Achse)] Darstellung als Histogramm mit Anzahl der Ereignisse auf der y-Achse und Fluoreszenz auf der x-Achse [rote Fläche = Leerprobe, schwarze Linie = jeweilige Messung]

a) Leerprobe; b) nach 1 Stunde; c) nach 2 Stunden; d) nach 4 Stunden; e) nach 6 Stunden; f) nach 24 Stunden

4. Ergebnisse

4.1. Darstellung der Fluoreszenzzunahme im Vergleich der Mikrosporidienart

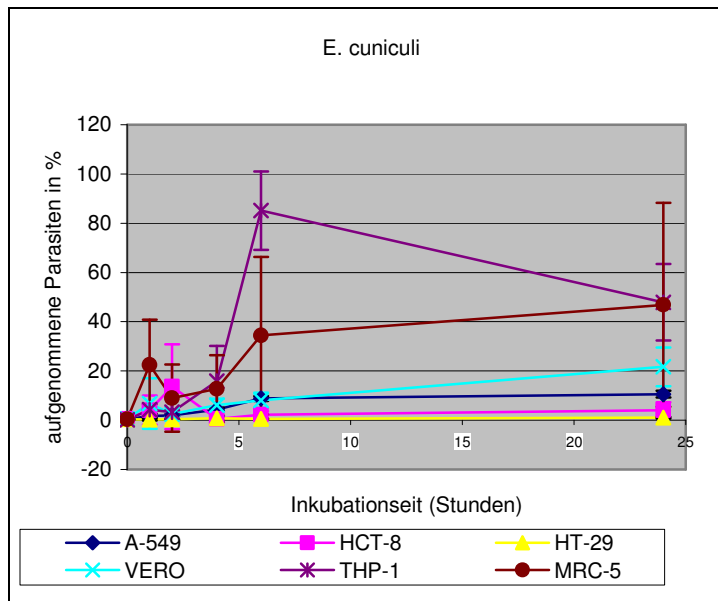
Durch die Markierung mit Fluoreszein-Isothiocyanat-Antikörper erhöhte sich die Fluoreszenz der Sporen und damit auch der infizierten Zelle. Die Fluoreszenz nimmt mit der Quantität der intrazellulären, markierten Sporen zu. Jede Zellart war fähig, Sporen aufzunehmen.

Bei *E. cuniculi* zeigte sich die größte Fluoreszenzzunahme bei den THP-1-Makrophagen nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden; der Wert war zu diesem Zeitpunkt signifikant höher als bei den anderen Zellsorten ($p = 0,02$). Nach 24 h zeigte sich eine Rückläufigkeit in der Fluoreszenz der THP-1-Makrophagen [siehe Abbildung 8]. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Bei den MRC-5-Zellen, den VERO-, HCT-8-, A-549- und den HT-29-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Bei *E. hellem* zeigte sich ebenfalls die größte Fluoreszenzzunahme nach 6 Stunden Inkubationszeit bei den THP-1-Zellen, hier war der Wert signifikant höher im Vergleich zu VERO-, HCT-8-, A-549- und den HT-29-Zellen ($p = 0,01$) allerdings nicht signifikant unterschiedlich zu den MRC-5 Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden signifikant höhere Werte bei den THP-1- und den MRC-5-Zellen im Vergleich zu den anderen Zellarten gemessen ($p < 0,02$), zwischen den Beiden bestand jedoch zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied.

Bei *E. intestinalis* zeigte sich ein signifikanter Unterschied nach 6 Stunden zwischen den THP-1-Zellen mit der größten und den HT-29-Zellen mit der geringsten Zunahme der Fluoreszenz.

Bei *V. corneae* zeigte sich die größte Zunahme der Fluoreszenz im Verlauf bei den MRC-5-Zellen, mit $p < 0,03$ signifikant zu den VERO-, HCT-8-, A-549- und den HT-29-Zellen nach zwei, vier, sechs und 24 Stunden, wobei der gemessene Wert nach sechs Stunden nicht signifikant höher war im Vergleich zu den THP-1-Zellen. Die anderen Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Zunahme der Fluoreszenz.



Inkubationszeit (Stunden)		1	2	4	6	24
E. cuniculi						
A-549	M	1,75	1,97	4,35	8,8	10,5
	S	0,81	0,37	0,66	0,95	1,35
HCT-8	M	4,08	13,6	0,56	2,15	4,09
	S	5,91	17,2	0,81	1,55	3,18
HT-29	M	0,27	0,36	0,81	0,5	0,3
	S	0,37	0,05	1,02	0,17	0,33
VERO	M	6,74	2,5	6,05	8,1	21,65
	S	10,27	0,81	2,68	3,01	7,83
THP-1	M	4,26	3,28	15,85	85,1	47,93
	S	2,24	0,76	14,3	15,9	15,62
MRC-5	M	22,4	9	12,8	34,4	46,9
	S	18,3	13,7	13,5	32	41,4

Abb. 8: Infektion der verschiedenen Zellarten mit *E. cuniculi*. Graphische Darstellung mit Auftragung der Mittelwerte und Standardabweichungen (Verbindung der Mittelwerte im Zeitverlauf) und Wertetabelle mit M=Mittelwert und S=Standardabweichung.

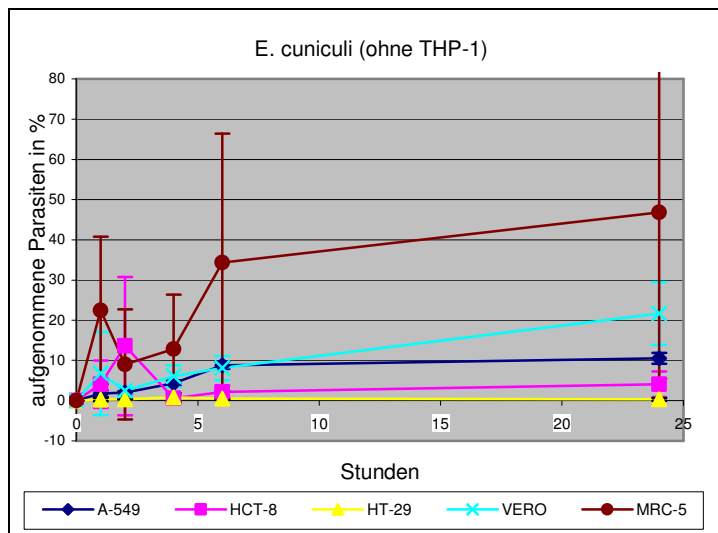
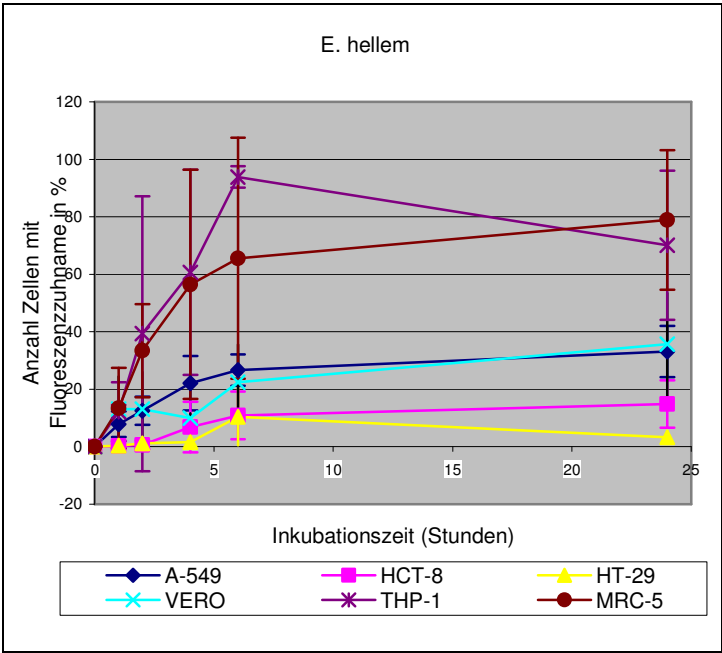


Abb. 9: Mittelwerte der intrazellulären Sporen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Gleiche Darstellung wie

Abb. 8: Infektion der verschiedenen Zellarten mit *E. cuniculi*. Graphische Darstellung mit Auftragung der Mittelwerte und Standardabweichungen (Verbindung der Mittelwerte im Zeitverlauf) und Wertetabelle ohne die Kurve der THP-1 Makrophage zur genaueren Darstellung im Anfangsbereich.



Inkubationszeit (Stunden)	E. hellem	1		2		4		6		24	
		M	S	M	S	M	S	M	S	M	S
A-549	M	7,82		12,51		22,1		26,7		33,1	
	S	4,4		4,9		9,47		5,47		8,87	
HCT-8	M	0,27		0,64		6,8		10,88		14,84	
	S	0,25		1,46		8,81		8,25		8,23	
HT-29	M	0,41		1,11		1,57		10,35		3,22	
	S	0,42		0,64		1,32		9,9		2,27	
VERO	M	13,07		13,05		9,98		22,39		35,61	
	S	11,33		12,92		1,63		13,16		18,0	
THP-1	M	12,16		39,33		60,66		93,86		70,13	
	S	10,28		47,87		35,69		3,74		25,91	
MRC-5	M	13,4		33,43		56,51		65,57		78,92	
	S	14,05		16,27		39,94		41,92		24,26	

Abb. 10: Infektion der verschiedenen Zellen mit *E. hellem*. Graphische Darstellung und mit Auftragung der Mittelwerte und Standardabweichungen (Verbindung der Mittelwerte im Zeitverlauf) und Wertetabelle mit M=Mittelwert und S=Standardabweichung.

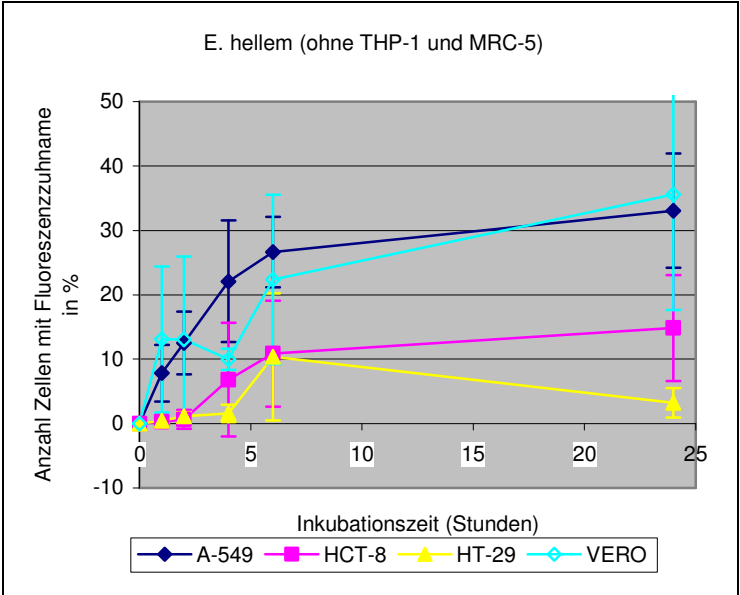
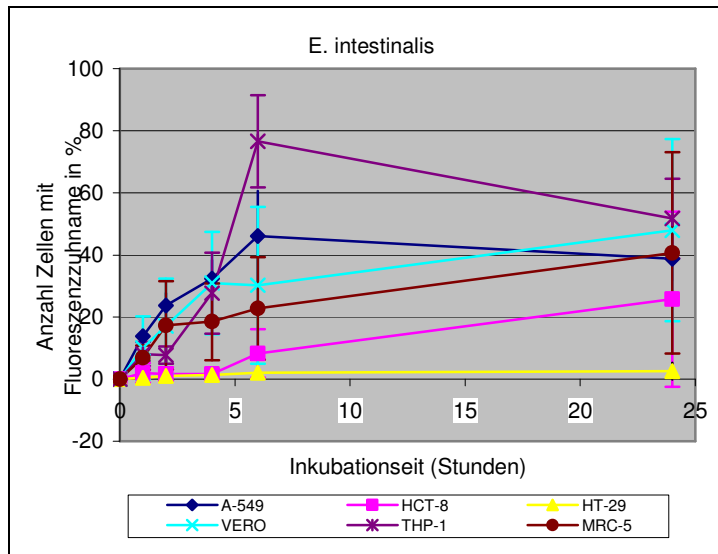


Abb. 11:
Mittelwerte der intrazellulären Sporen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Gleiche Darstellung wie Abb. 10: Infektion der verschiedenen Zellen mit *E. hellem*. Graphische Darstellung und ohne die Kurve der THP-1 Makrophagen und MRC-5 Zellen.



Inkubationszeit (Stunden)		1	2	4	6	24
E. intestinalis						
A-549	M	13,77	23,71	32,38	46,12	38,79
	S	2,3	4,0	6,0	14,5	6,98
HCT-8	M	1,96	1,66	1,58	8,26	25,72
	S	3,15	2,16	1,56	7,80	28,25
HT-29	M	0,38	1,0	1,36	2,03	2,56
	S	0,34	1,04	0,70	1,17	2,67
VERO	M	9,97	17,06	30,94	30,24	48,0
	S	10,23	15,39	16,51	25,30	29,38
THP-1	M	8,07	7,71	27,72	76,61	51,79
	S	3,84	2,75	13,07	14,84	12,82
MRC-5	M	6,92	17,31	18,48	22,80	40,65
	S	3,92	14,25	12,40	16,54	32,48

Abb. 12: Infektion der verschiedenen Zellarten mit *E. intestinalis*. Graphische Darstellung mit Auftragung der Mittelwerte und Standardabweichungen (Verbindung der Mittelwerte im Zeitverlauf) und Wertetabelle mit M=Mittelwert und S=Standardabweichung.

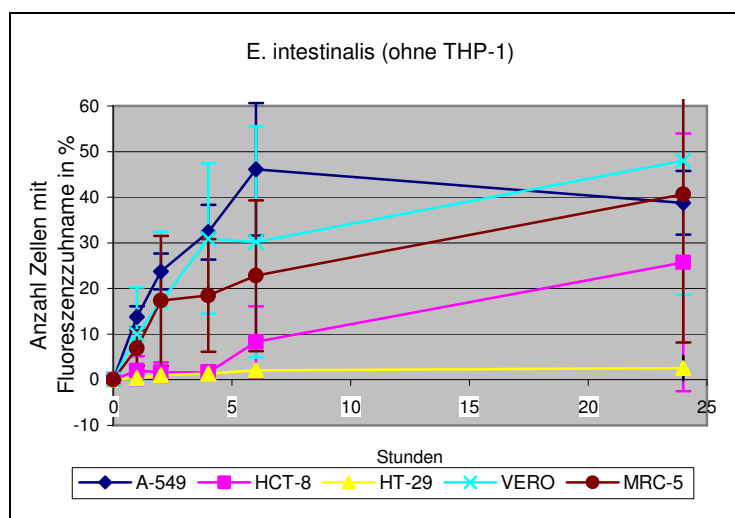
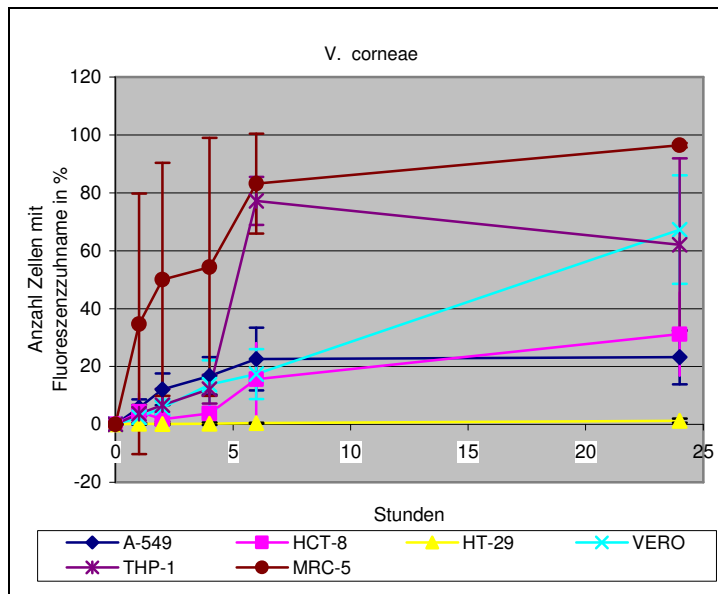


Abb. 13:

Mittelwerte der Zunahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Gleiche Darstellung wie Abb. 8 ohne die Kurve der THP-1 Makrophagen.



Inkubationszeit (Stunden) V. corneae						
		1	2	4	6	24
A-549	M	5,72	12,07	16,74	22,58	23,23
	S	2,94	5,47	6,41	10,89	9,40
HCT-8	M	4,3	1,77	3,76	15,63	31,19
	S	6,45	1,14	1,99	12,44	14,43
HT-29	M	0,17	0,08	0,24	0,40	1,26
	S	0,24	0,28	0,46	0,18	0,69
VERO	M	2,38	5,78	13,70	17,34	67,33
	S	2,14	2,78	8,37	8,58	18,76
THP-1	M	3,61	6,62	12,14	77,27	62,1
	S	3,13	5,66	4,97	8,27	29,82
MRC-5	M	34,74	50,10	54,40	83,2	96,51
	S	44,98	40,24	44,56	17,2	0,77

Abb. 14: Infektion der verschiedenen Zellarten mit *V. corneae*. Graphische Darstellung mit Auftragung der Mittelwerte und Standardabweichungen (Verbindung der Mittelwerte im Zeitverlauf) und Wertetabelle mit M=Mittelwert und S=Standardabweichung.

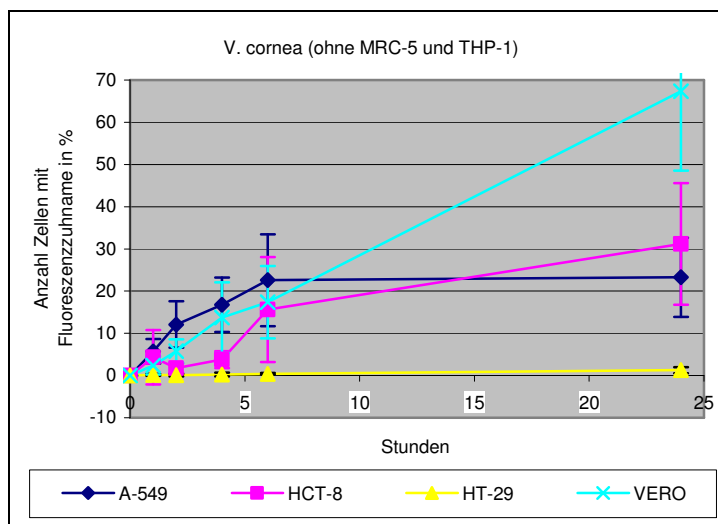


Abb. 15:
Mittelwerte der Zunahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.
Gleiche Darstellung wie

Abb. 14: Infektion der verschiedenen Zellarten mit *V. corneae*. Graphische Darstellung ohne die Kurve der THP-1 Makrophagen und MRC-5 Zellen.

4.2. Darstellung der Fluoreszenzzunahme im Vergleich der Zellarten

Bei der Betrachtung der Fluoreszenzzunahme nach Phagozytierung der Sporen durch THP-1-Makrophagen fällt auf, dass sich bei allen vier Erregern eine stetige Zunahme bis zu 6 Stunden Inkubationszeit zeigt, dann jedoch eine Rückläufigkeit in der fluoreszierenden Eigenschaft eintritt (Abb. 12). Nach vier Stunden Inkubationszeit zeigte sich der deutlichste Unterschied zwischen *E. hellem* und den anderen Erregern, welcher mit $p < 0,05$ signifikant war. Auch zu den anderen Zeitpunkten schienen die Fluoreszenzwerte bei *E. hellem* am höchsten zu sein, dies war jedoch nicht statistisch signifikant.

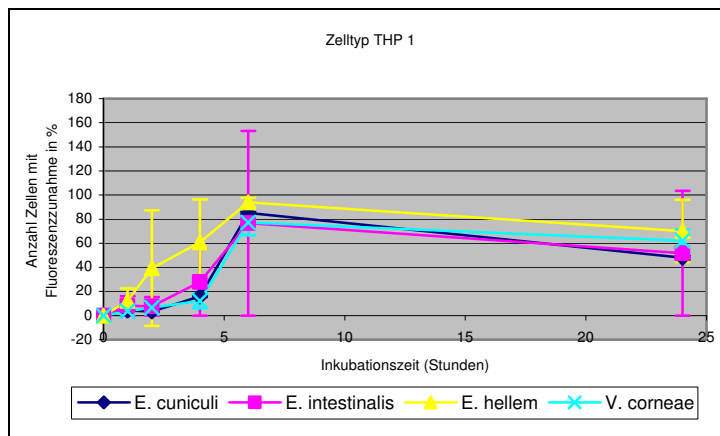
Bei den Darmzellen zeigte sich bei allen Erregern eine lineare Zunahme der Fluoreszenz bis zu 24 Stunden Inkubationszeit. Zu keinem Zeitpunkt bestand ein signifikanter Unterschied (Abb. 13). Im Vergleich mit den anderen Zellarten war die Fluoreszenzzunahme deutlich geringer.

Bei den HT-29-Zellen waren generell die Prozentwerte der Fluoreszenzzunahme am geringsten. Hier bestand zu keinem Inkubationszeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Parasiten (Abb. 14).

Nach der Infektion der Lungenzelllinie A549 mit den einzelnen Mikrosporidien und der anschließenden Messung der Fluoreszenzzunahme zeigte sich zu jedem Inkubationszeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen *E. intestinalis* und *E. cuniculi* ($p < 0,01$), wobei die Fluoreszenz bei *E. intestinalis* höher war. Im Vergleich mit *V. corneae* und *E. hellem* war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant.

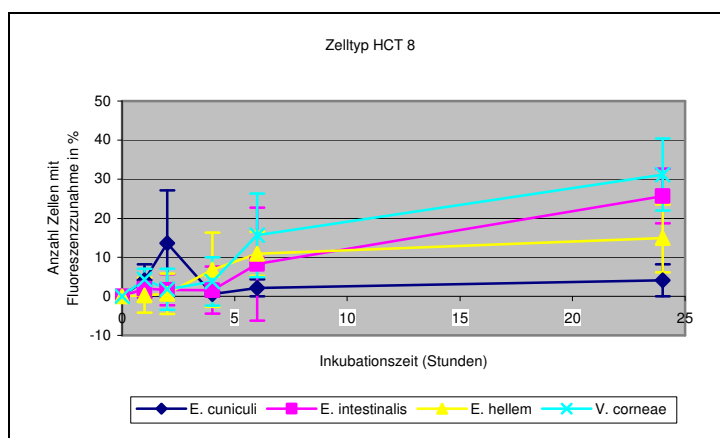
Die gemessene Fluoreszenz bei der Lungenzelllinie MRC5 war insgesamt stärker als die der A549 Lungenzellen. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Mikrosporidien waren jedoch nicht signifikant.

Die Fluoreszenzzunahme bei den VERO Zellen war vergleichbar mit derjenigen von HCT-8 Zellen. Die Unterschiede zwischen den Mikrosporidienarten waren jedoch nicht signifikant (Abb. 17).



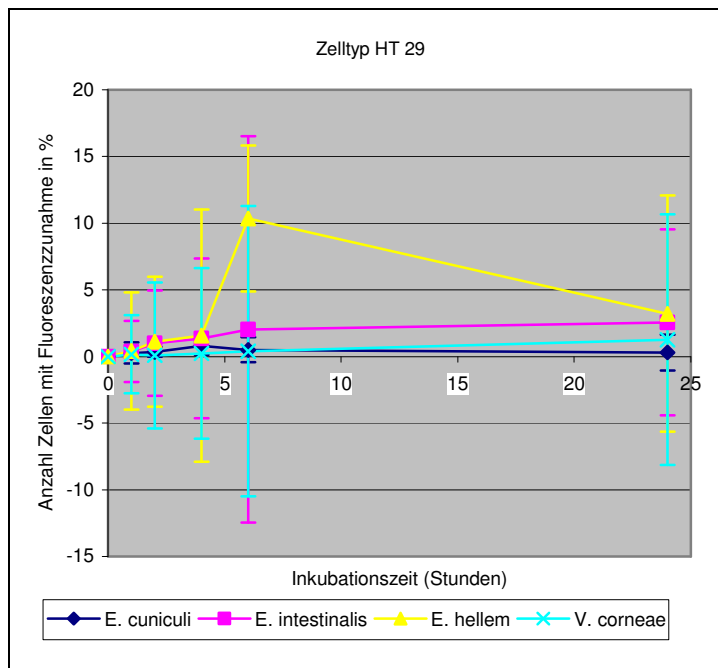
Inkubationszeit (Stunden) Thp1	1		2	4	6	24
	M	S				
E. cuniculi	M	4,26	3,28	15,85	85,1	47,93
	S	2,24	0,76	14,3	15,9	15,62
V. corneae	M	3,61	6,62	12,14	77,27	62,1
	S	3,13	5,66	4,97	8,27	29,82
E. hellem	M	12,16	39,33	60,66	93,86	70,13
	S	10,28	47,87	35,69	3,74	25,91
E. intestinalis	M	8,07	7,71	27,72	76,61	51,79
	S	3,84	2,75	13,07	14,84	12,82

Abb. 16: Infektion von THP-1-Makrophagen mit den vier Mikrosporidienarten. Graphische Darstellung und Wertetabelle der Mittelwerte (M) der Zellen in Prozent, die eine Fluoreszenzzunahme zeigten und der Standardabweichung (S) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.



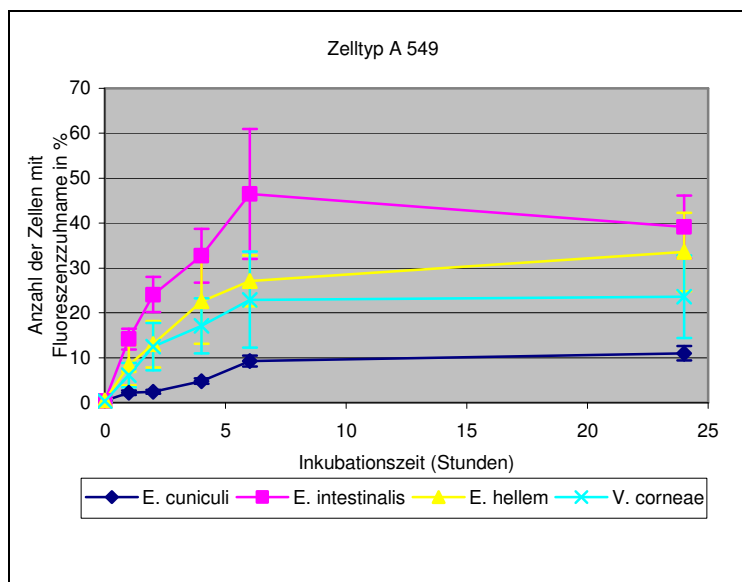
Inkubationszeit (Stunden) HCT 8	1		2	4	6	24
	M	S				
E. cuniculi	M	4,08	13,6	0,56	2,15	4,09
	S	5,91	17,2	0,81	1,55	3,18
V. corneae	M	4,3	1,77	3,76	15,63	31,19
	S	6,45	1,14	1,99	12,44	14,43
E. hellem	M	0,27	0,64	6,8	10,88	14,84
	S	0,25	1,46	8,81	8,25	8,23
E. intestinalis	M	1,96	1,66	1,58	8,26	25,72
	S	3,15	2,16	1,56	7,80	28,25

Abb. 17: Infektion von HCT-8-Zellen mit den vier Mikrosporidienarten. Graphische Darstellung und Wertetabelle der Mittelwerte (M) der Zellen in Prozent, die eine Fluoreszenzzunahme zeigten und der Standardabweichung (S) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.



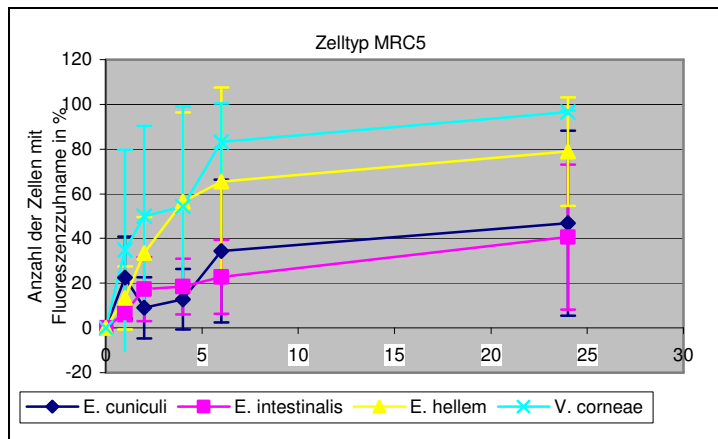
Inkubationszeit (Stunden)		1	2	4	6	24
HT 29						
E. cuniculi	M	0,27	0,36	0,81	0,5	0,3
	S	0,37	0,05	1,02	0,17	0,33
V. corneae	M	0,17	0,08	0,24	0,40	1,26
	S	0,24	0,28	0,46	0,18	0,69
E. hellem	M	0,41	1,11	1,57	10,35	3,22
	S	0,42	0,64	1,32	9,9	2,27
E. intestinalis	M	0,38	1,0	1,36	2,03	2,56
	S	0,34	1,04	0,70	1,17	2,67

Abb. 18: Infektion von HT-29-Zellen mit den vier Mikrosporidienarten. Graphische Darstellung und Wertetabelle der Mittelwerte (M) der Zellen in Prozent, die eine Fluoreszenzzunahme zeigten und der Standardabweichung (S) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.



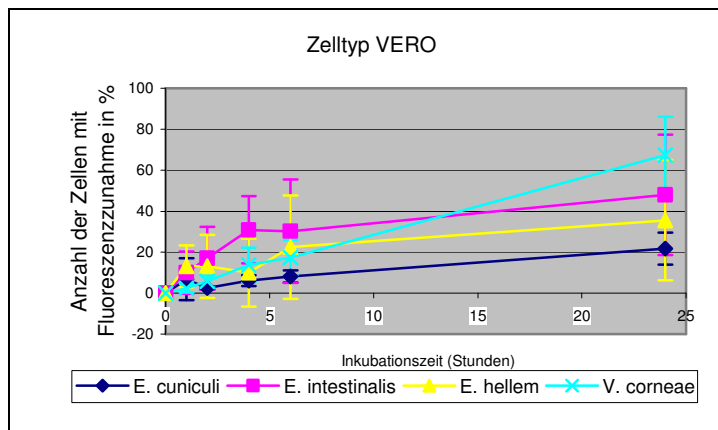
Inkubationszeit (Stunden)		1	2	4	6	24
A 549						
E. cuniculi	M	1,75	1,97	4,35	8,8	10,5
	S	0,81	0,37	0,66	0,95	1,35
V. corneae	M	5,72	12,07	16,74	22,58	23,23
	S	2,94	5,47	6,41	10,89	9,40
E. hellem	M	7,82	12,51	22,1	26,7	33,1
	S	4,4	4,9	9,47	5,47	8,87
E. intestinalis	M	13,77	23,71	32,38	46,12	38,79
	S	2,3	4,0	6,0	14,5	6,98

Abb. 19 : Infektion von A 549-Zellen mit den vier Mikrosporidienarten. Graphische Darstellung und Wertetabelle der Mittelwerte (M) der Zellen in Prozent, die eine Fluoreszenzzunahme zeigten und der Standardabweichung (S) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.



Inkubationszeit (Stunden) MRC 5	1		2	4	6	24
E. cuniculi	M	22,4	9	12,8	34,4	46,9
	S	18,3	13,7	13,5	32	41,4
V. corneae	M	34,74	50,10	54,40	83,2	96,51
	S	44,98	40,24	44,56	17,2	0,77
E. hellem	M	13,4	33,43	56,51	65,57	78,92
	S	14,05	16,27	39,94	41,92	24,26
E. intestinalis	M	6,92	17,31	18,48	22,80	40,65
	S	3,92	14,25	12,40	16,54	32,48

Abb. 20 : Infektion von MRC-5-Zellen mit den vier Mikrosporidienarten. Graphische Darstellung und Wertetabelle der Mittelwerte (M) der Zellen in Prozent, die eine Fluoreszenzzunahme zeigten und der Standardabweichung (S) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.



Inkubationszeit (Stunden) MRC 5	1		2	4	6	24
E. cuniculi	M	22,4	9	12,8	34,4	46,9
	S	18,3	13,7	13,5	32	41,4
V. corneae	M	34,74	50,10	54,40	83,2	96,51
	S	44,98	40,24	44,56	17,2	0,77
E. hellem	M	13,4	33,43	56,51	65,57	78,92
	S	14,05	16,27	39,94	41,92	24,26
E. intestinalis	M	6,92	17,31	18,48	22,80	40,65
	S	3,92	14,25	12,40	16,54	32,48

Abb. 21: Infektion von VERO-Zellen mit den vier Mikrosporidienarten. Graphische Darstellung und Wertetabelle der Mittelwerte (M) der Zellen in Prozent, die eine Fluoreszenzzunahme zeigten und der Standardabweichung (S) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

5. Diskussion

Unterschiedliche Mikrosporidienarten rufen beim Menschen unterschiedliche Symptome hervor.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zu zeigen, ob bei vier humanpathogenen Mikrosporidienpezies ein Zelltropismus vorliegt, oder ob die unterschiedlichen Erkrankungen, wie bisher angenommen, hauptsächlich auf den Übertragungsweg zurückzuführen sind. Es gibt nur wenige Untersuchungen mit ähnlichem Aufbau und der Fragestellung nach der Aufnahme von Mikrosporidien durch unterschiedliche Zellsorten. Couzin et al. infizierte vier verschiedene Zellarten mit *E. cuniculi*, um die Sporenaufnahme durch professionelle und nicht-professionelle Phagozyten zu vergleichen [10]. In einer Parallelarbeit von Franzen et al erfolgte in einem ähnlichem Versuchsaufbau eine lichtmikroskopische Quantifizierung mit der gleichen Fragestellung [36]. Hierbei wurden die Zellen in 24-Wellplatten auf Deckgläschen kultiviert und infiziert. Nach der Infizierung und dem Abstoppen der Reaktion konnte die Färbung ohne ein Ablösen der Zellen erfolgen. Als Färbung wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung verwendet, wodurch sowohl intrazelluläre Sporen als auch extrazelluläre Sporen und Polfäden dargestellt und differenziert werden konnten. Es konnten sogar, genau so wie in einer Arbeit von Franzen et al. [33], Polfäden abgebildet werden, die durch ihre teils intra-, und teils extrazelluläre Lage zweifarbig waren.

Dass auch die Durchflusszytometrie ein geeignetes Instrument zur Quantifizierung der intrazellulären Mikrosporidien darstellt, wurde bereits bei Franzen et al. 2004 durch die Infektion verschiedener Zelllinien mit *E. cuniculi* gezeigt [41].

In der vorliegenden Arbeit wurden sechs verschiedene Zellsorten (THP-1-Makrophagen, Vero-, MRC-5, A549-, HCT-8- und HT29- Zellen) mit Sporen von *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis* und *V. corneae* für je 1,2, 4, 6, und 24 Stunden inkubiert. Jede Zellsorte nahm nach Phagozytose der Sporen an Fluoreszenz zu, jedoch in sehr unterschiedlicher Ausprägung. Es gab auch innerhalb der durchgeführten Experimente erhebliche Unterschiede in der Sporenaufnahme, was bereits bei Couzin et al. 2000 in einer Studie über die Aufnahme von *E. cuniculi* in nicht professionelle Makrophagen aufgefallen war [10]. Die Fluoreszenz nahm bei den THP-1 Makrophagen im Vergleich zu den anderen Zellsorten

innerhalb der ersten 6 Stunden bei allen Sporen stärker zu. Auffällig war allerdings, dass die Fluoreszenz nach 6 Stunden Inkubationszeit wieder abfiel. Nach 24 Stunden zeigte sich bei den THP-1 Makrophagen eine weitaus geringere Fluoreszenz. In der Studie von Franzen et al. zeigte sich jedoch ein kontinuierlicher Anstieg der intrazellulären Sporen bei den THP-1 Zellen.

Dies könnte darin begründet liegen, dass nach vermehrter und schnellerer Phagozytose der Sporen die Makrophagen empfindlicher werden und somit durch den Waschvorgang leichter lysieren. Folge davon wäre, dass gerade die Zellen mit einer deutlich erhöhten Sporenaufnahme in der Durchflusszytometrie nicht mehr erfasst werden können. Warum die Ergebnisse bezüglich der THP-1 Makrophagen in der lichtmikroskopisch kontrollierten Paralleluntersuchung gerade in der Messung nach 24 Stunden deutlich abweichen, könnte mehrere Gründe haben. Zum einen wurden die THP-1 Zellen in der lichtmikroskopischen Studie mittels Phorbol ausdifferenziert, was zu einer Anhaftung auf dem Untergrund führte. Die Ausdifferenzierung könnte neben höherer Stabilität der Zellen auch zu einer verbesserten Sporenaufnahme geführt haben. Zum anderen mussten die Zellen nach Infektion zur Doppelimmunfluoreszenzfärbung nicht mehr in ein anderes Medium überführt werden und waren deshalb auch keinem weiteren Waschvorgang ausgesetzt was eine Lyse der Zellen hätte provozieren können. In Vorversuchen konnte festgestellt werden, dass die THP-1 Zellen in Suspension verwendet werden müssen, da nach einer Ausdifferenzierung eine ausreichende Ablösung zur durchflusszytometrischen Untersuchung nicht mehr möglich war. Eine weitere Erklärung für den Abfall der Fluoreszenz nach 24 Stunden gerade bei den professionellen Phagozyten könnte sich auch durch ein rasches Abtöten der Erreger erklären. Gegen diese Vermutung spricht jedoch die kontinuierliche Zunahme der intrazellulären Sporen bei den THP-1 Zellen in der lichtmikroskopischen Untersuchung von Franzen et al [36]. Ebenso würde man eine längere Zeitspanne zum Abtöten der Erreger annehmen. In einer Untersuchung von Franzen et al. verschwanden aufgenommene Erreger aus den endolysosomalen Kompartimenten innerhalb von drei Tagen [42].

Bei *V. corneae* war die Fluoreszenz der MRC-5 Zellen mit der der THP-1 Makrophagen vergleichbar hoch. Allerdings erfolgte bei den MRC-5 Zellen ein stetiger Anstieg der Fluoreszenz ohne Abfall nach sechs Stunden. Die vermehrte Aufnahme der *V. corneae*-Spore durch die MRC-5 Zellen könnte in der Ähnlichkeit der Lungenfibroblasten mit den cornealen Keratozyten begründet liegen. In der lichtmikroskopischen Arbeit zeigte sich hingegen eine außergewöhnlich starke Aufnahme von *E. intestinalis* in die MRC-5 Zellen [36].

Bei *E. cuniculi* nahm die Fluoreszenz der MRC-5 Zellen signifikant zu im Vergleich zu den VERO-, HCT-8 und HT-29 Zellen. Dies konnte im Versuchsaufbau mit dem Fluoreszenzmikroskop nicht gezeigt werden [36].

Durchflusszytometrisch zeigte sich eine vermehrte Aufnahme von der *V. cornea*-Spore durch die VERO-Zellen. Bei den VERO-Zellen handelt es sich um eine Epithelzelle aus Affennieren; passend erscheint, dass ein auch durch *Vittaforma corneae* hervorgerufenes Krankheitsbild die Infektion der ableitenden Harnwege ist [14,16].

Die Darmzelllinie HCT-8 zeigte eine steigende Fluoreszenzzunahme im Zeitverlauf für *E. intestinalis* und *V. corneae*, was die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchung stützt. HT-29 Zellen, ebenfalls eine Darmzelle, phagozytierten in allen Versuchen nur wenige Sporen. Gleiches zeigte sich auch bei Franzen et al. [36].

Gegenüber der lichtmikroskopischen Untersuchung bietet die Durchflusszytometrie bezüglich der Quantifizierung Vorteile durch eine schnellere Durchführung und bessere Objektivierbarkeit. Nachteilig an dieser Methode ist, dass die Sporenanzahl nur indirekt durch Zunahme der Fluoreszenz nachgewiesen wurde. Somit konnten keine einzelnen Sporen dargestellt werden, sondern nur Fluoreszenzänderungen der infizierten Zellen. Auf die Infektionswege der Mikrosporidien bezogen konnten in dieser Arbeit nur Sporen erfasst werden, die durch Endozytose in die Zellen aufgenommen wurden. Sporen, die die Zelle von extrazellulär aktiv infizierten über Penetration des Polfadens, kamen nicht zur Darstellung. Somit könnten unterschiedliche Ergebnisse in der lichtmikroskopischen und der durchflusszytometrischen Untersuchung auch durch bevorzugte Infektionswege der einzelnen Parasiten entstanden sein. Bisher gibt es noch keine Untersuchungen mit der Fragestellung nach bevorzugten Infektionswegen unterschiedlicher Mikrosporidienarten bei unterschiedlichen Zellen. Es ist möglich, dass manche Zellsorten durch Expression bestimmter Rezeptoren bestimmte Sporen bevorzugt über Endozytose aufnehmen [10] oder Membranbestandteile bestimmter Zellen ein Herausschleudern des Polfadens fördern.

In der vorliegenden durchflusszytometrischen Untersuchung konnte ebenso wenig wie in der parallelen lichtmikroskopischen Arbeit ein eindeutiger Hinweis erbracht werden, dass die Verteilung der unterschiedlichen Mikrosporidienarten im menschlichen Organismus mit den nachgewiesenen Infektionen auf einem Zelltropismus der jeweiligen Erregerart beruht.

Es ist zu bedenken, dass es sich um invitro Versuche handelt und somit viele Faktoren die das menschliche Milieu für die Erreger bietet unterschlagen werden und dass die untersuchten Zellen Tumorzelllinien entsprachen und somit zusätzlich nicht die Realität gesunder menschlicher Zellen abbilden.

Aufgrund der relativ kurzen Inkubationszeit von 24 Stunden ist nicht klar ob die Anzahl der aufgenommenen Sporen auch mit den proliferierenden Erregern, die die Infektion tragen, korreliert.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit invitro kein Zelltropismus für die untersuchten Mikrosporidienarten ermittelt werden. Somit scheint die Entwicklung der Unterschiedlichen Symptome und Erkrankungsbilder, die mit Mikrosporidien assoziiert werden, hauptsächlich auf der Aufnahme, dem Übertragungsweg und Übertragungsmedium zu beruhen. Durch Infektionen im Respirations- und Gastrointestinaltrakt von Menschen und Tieren werden die Sporen über respiratorische Sekrete, sowie Urin und Stuhl ausgeschieden. Dies ermöglicht den Parasiten Infektionen über die Inhalation kontaminierter Aerosole, oral-oralem oder fäkal-oralem Weg. Ebenso ist eine Infektion durch die Aufnahme von kontaminiertem Wasser oder auf sexuellem Übertragungsweg möglich.

Nach der AIDS Pandemie der 80er Jahre zeigen sich deutlich abnehmende Fallzahlen, vor allem in den Regionen der Welt, in denen Patienten moderne Medikamente zur Kontrolle von HIV Infektionen zur Verfügung stehen. Es konnten jedoch in letzter Zeit häufiger schwere Infektionen bei Organ-, und Knochenmarkstransplantierten beschrieben werden, die unter immunsuppressiver Behandlung standen [47,50-52,61,65,81,97]. Die Infektionen mit Mikrosporidien sind sicher aufgrund mehrerer oben bereits erwähnter Faktoren unterschätzt.

Hinsichtlich des breiten Symptomspektrums, das diese Erreger hervorrufen können sollte bei Risikopatienten ein Einschluss in die differentialdiagnostischen Erwägungen erfolgen. Vor allem bei protrahierten Infektionen, die unter den gängigen antibiotischen, antiviralen und antimykotischen Medikamenten kein Ansprechen zeigen.

7. Literaturverzeichnis

- (1) Bacchi CJ, Weiss LM. Chemotherapy of microsporidiosis: benzimidazoles, fumagilin, and polyamine analogues. In: Lindsay DS, Weiss LM, editors. Opportunistic infections: toxoplasma, sarcozystis and microsporidia. Boston: 2004: 159-188.
- (2) Balbiani G. Sur les microsporidies ou psorospermies des artucules. C R Hebd Seances Acad Sci Paris 1882; 95:1168-1171.
- (3) Beauvais B, Sarfati C, Challier S, Derouin F. In vitro model to assess effect of antimicrobial agents on *Encephalitozoon cuniculi*
Antimicrob Agents Chemother 1994; 38(10):2440-2448.
- (4) Bigliardi E, Sacchi L. Cell biology and invasion of the microsporidia. Microbes Infect 2001; 3(5):373-379.
- (5) Cali A. General microsporidian features and recent findings on AIDS isolates
J Protozool 1991; 38(6):625-630.
- (6) Cali A, Kotler DP, Orenstein JM. *Septata intestinalis* N. G., N. Sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients
J Eukaryot Microbiol 1993; 40(1):101-112.
- (7) Canning EU. Microsporidia. Principles and Practice of Clinical Parasitology. 2001.
- (8) Chan CM, Theng JT, Li L, Tan DT. Microsporidial keratoconjunctivitis in healthy individuals: a case series
Ophthalmology 2003; 110(7):1420-1425.
- (9) Contreas CN, Berlin OG, Ash LR, Pruthi JS. Therapy for human gastrointestinal microsporidiosis. Am J Trop Med Hyg 2000; 63(3-4):121-127.
- (10) Couzinet S, Cejas E, Schittny J, Deplazes P, Weber R, Zimmerli S. Phagocytic uptake of *Encephalitozoon cuniculi* by nonprofessional phagocytes
Infect Immun 2000; 68(12):6939-6945.
- (11) Coyle C, Kent M, Tanowitz HB, Wittner M, Weiss LM. TNP-470 is an effective antimicrosporidial agent
J Infect Dis 1998; 177(2):515-518.

- (12) Dascomb K, Clark R, Aberg J, Pulvirenti J, Hewitt RG, Kissinger P et al. Natural history of intestinal microsporidiosis among patients infected with human immunodeficiency virus
J Clin Microbiol 1999; 37(10):3421-3422.
- (13) Dascomb K, Frazer T, Clark RA, Kissinger P, Didier E. Microsporidiosis and HIV
J Acquir Immune Defic Syndr 2000; 24(3):290-292.
- (14) Davis RM, Font RL, Keisler MS, Shadduck JA. Corneal microsporidiosis. A case report including ultrastructural observations
Ophthalmology 1990; 97(7):953-957.
- (15) Deplazes P, Mathis A, Baumgartner R, Tanner I, Weber R. Immunologic and molecular characteristics of Encephalitozoon-like microsporidia isolated from humans and rabbits indicate that Encephalitozoon cuniculi is a zoonotic parasite
Clin Infect Dis 1996; 22(3):557-559.
- (16) Deplazes P, Mathis A, van Saanen M, Iten A, Keller R, Tanner I et al. Dual microsporidial infection due to Vittaforma corneae and Encephalitozoon hellem in a patient with AIDS
Clin Infect Dis 1998; 27(6):1521-1524.
- (17) Deplazes P, Mathis A, Weber R. Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds
Contrib Microbiol 2000; 6:236-260.
- (18) Desportes I, Le Charpentier Y, Galian A, Bernard F, Cochand-Priollet B, Lavergne A et al. Occurrence of a new microsporidan: Enterocytozoon bieneusi n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. J Protozool 1985; 32(2):250-254.
- (19) Didier ES, Bowers L, Stovall ME, Kuebler D, Mittleider D, Brindley PJ et al. Antimicrosporidial activity of (fluoro)quinolones in vitro and in vivo
Folia Parasitol (Praha) 2005; 52(1-2):173-181.
- (20) Didier ES, Didier PJ, Friedberg DN, Stenson SM, Orenstein JM, Yee RW et al. Isolation and characterization of a new human microsporidian, Encephalitozoon hellem (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. J Infect Dis 1991; 163(3):617-621.

- (21) Didier ES, Didier PJ, Snowden KF, Shadduck JA. Microsporidiosis in mammals. *Microbes Infect* 2000; 2(6):709-720.
- (22) Didier ES, Maddry JA, Brindley PJ, Stovall ME, Didier PJ. Therapeutic strategies for human microsporidia infections
Expert Rev Anti Infect Ther 2005; 3(3):419-434.
- (23) Didier ES, Snowden KF, Shadduck JA. Biology of microsporidian species infecting mammals. *Adv Parasitol* 1998; 40:283-320.
- (24) Didier PJ, Phillips JN, Kuebler DJ, Nasr M, Brindley PJ, Stovall ME et al. Antimicrosporidial activities of fumagillin, TNP-470, ovalicin, and ovalicin derivatives in vitro and in vivo
Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(6):2146-2155.
- (25) Ditrich O, Kucerova Z, Koudela B. In vitro sensitivity of *Encephalitozoon cuniculi* and *E. hellem* to albendazole
J Eukaryot Microbiol 1994; 41(5):37S.
- (26) Dore GJ, Marriott DJ, Hing MC, Harkness JL, Field AS. Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in nine patients infected with the human immunodeficiency virus: response to therapy with albendazole
Clin Infect Dis 1995; 21(1):70-76.
- (27) Edlind TD, Li J, Visvesvara GS, Vodkin MH, McLaughlin GL, Katiyar SK. Phylogenetic analysis of beta-tubulin sequences from amitochondrial protozoa
Mol Phylogenet Evol 1996; 5(2):359-367.
- (28) Field AS, Hing MC, Milliken ST, Marriott DJ. Microsporidia in the small intestine of HIV-infected patients. A new diagnostic technique and a new species
Med J Aust 1993; 158(6):390-394.
- (29) Flepp M, Sauer B, Lüthy R, Weber R. Human microsporidiosis in HIV-seronegative, immunocompetent patients. Abstracts of the 35th ICAAC abstr. LM25, p. 331. 1996.
- (30) Font RL, Su GW, Matoba AY. Microsporidial stromal keratitis
Arch Ophthalmol 2003; 121(7):1045-1047.
- (31) Foucault C, Drancourt M. Actin mediates *Encephalitozoon intestinalis* entry into the human enterocyte-like cell line, Caco-2
Microb Pathog 2000; 28(2):51-58.

- (32) Franssen FF, Lumeij JT, van Knapen F. Susceptibility of *Encephalitozoon cuniculi* to several drugs in vitro
Antimicrob Agents Chemother 1995; 39(6):1265-1268.
- (33) Franzen C. Microsporidia: how can they invade other cells? Trends Parasitol 2004; 20(6):275-279.
- (34) Franzen C. How do microsporidia invade cells? Folia Parasitol (Praha) 2005; 52(1-2):36-40.
- (35) Franzen C, Fatkenheuer G, Salzberger B, Muller A, Mahrle G, Diehl V et al. Intestinal microsporidiosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome--report of three more German cases
Infection 1994; 22(6):417-419.
- (36) Franzen C, Hosl M, Salzberger B, Hartmann P. Uptake of *Encephalitozoon* spp. and *Vittaforma corneae* (Microsporidia) by different cells
J Parasitol 2005; 91(4):745-749.
- (37) Franzen C, Muller A. Cryptosporidia and microsporidia--waterborne diseases in the immunocompromised host. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 34(3):245-262.
- (38) Franzen C, Muller A. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. Clin Microbiol Rev 1999; 12(2):243-285.
- (39) Franzen C, Muller A. Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. Microbes Infect 2001; 3(5):389-400.
- (40) Franzen C, Muller A, Hartmann P, Kochanek M, Diehl V, Fatkenheuer G. Disseminated *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* infection in a patient with AIDS
N Engl J Med 1996; 335(21):1610-1611.
- (41) Franzen C, Muller A, Hartmann P, Salzberger B. Quantitation of microsporidia in cultured cells by flow cytometry. Cytometry A 2004; 60(1):107-114.
- (42) Franzen C, Muller A, Hartmann P, Salzberger B. Cell invasion and intracellular fate of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia). Parasitology 2005; 130(Pt 3):285-292.

- (43) Franzen C, Muller A, Schwenk A, Salzberger B, Fatkenheuer G, Mahrle G et al. Intestinal microsporidiosis with *Septata intestinalis* in a patient with AIDS--response to albendazole
J Infect 1995; 31(3):237-239.
- (44) Franzen C, Nassonova ES, Scholmerich J, Issi IV. Transfer of the members of the genus *Brachiola* (microsporidia) to the genus *Anncaliia* based on ultrastructural and molecular data
J Eukaryot Microbiol 2006; 53(1):26-35.
- (45) Franzen C, Schwartz DA, Visvesvara GS, Muller A, Schwenk A, Salzberger B et al. Immunologically confirmed disseminated, asymptomatic *Encephalitozoon cuniculi* infection of the gastrointestinal tract in a patient with AIDS. Clin Infect Dis 1995; 21(6):1480-1484.
- (46) Frixone Eeal. Dynamics of polar filament discharge and sporoplasm expulsion by microsporidian spores. Cell Motil Cytoskeleton 1992;(22):38-50.
- (47) Gamboa-Dominguez A, De Anda J, Donis J, Ruiz-Maza F, Visvesvara GS, Diliz H. Disseminated encephalitozoon cuniculi infection in a Mexican kidney transplant recipient
Transplantation 2003; 75(11):1898-1900.
- (48) Garcia LS. Laboratory identification of the microsporidia
J Clin Microbiol 2002; 40(6):1892-1901.
- (49) Germot A, Philippe H, Le Guyader H. Evidence for loss of mitochondria in Microsporidia from a mitochondrial-type HSP70 in *Nosema locustae*
Mol Biochem Parasitol 1997; 87(2):159-168.
- (50) Goetz M, Eichenlaub S, Pape GR, Hoffmann RM. Chronic diarrhea as a result of intestinal microsporidiosis in a liver transplant recipient
Transplantation 2001; 71(2):334-337.
- (51) Guerard A, Rabodonirina M, Cotte L, Liguory O, Piens MA, Daoud S et al. Intestinal microsporidiosis occurring in two renal transplant recipients treated with mycophenolate mofetil
Transplantation 1999; 68(5):699-707.
- (52) Gumbo T, Hobbs RE, Carlyn C, Hall G, Isada CM. Microsporidia infection in transplant patients
Transplantation 1999; 67(3):482-484.

- (53) Hartskeerl RA, van Gool T, Schuitema AR, Didier ES, Terpstra WJ. Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*
Parasitology 1995; 110 (Pt 3):277-285.
- (54) He Q, Leitch GJ, Visvesvara GS, Wallace S. Effects of nifedipine, metronidazole, and nitric oxide donors on spore germination and cell culture infection of the microsporidia *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon intestinalis*
Antimicrob Agents Chemother 1996; 40(1):179-185.
- (55) Hirt RP, Healy B, Vossbrinck CR, Canning EU, Embley TM. A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria
Curr Biol 1997; 7(12):995-998.
- (56) Hirt RP, Logsdon JM, Jr., Healy B, Dorey MW, Doolittle WF, Embley TM. Microsporidia are related to Fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins
Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96(2):580-585.
- (57) Hutin YJ, Sombardier MN, Liguory O, Sarfati C, Derouin F, Modai J et al. Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection: a case-control study
J Infect Dis 1998; 178(3):904-907.
- (58) Keeling PJ. Parasites go the full monty. Nature 2001; 414(6862):401-402.
- (59) Keeling PJ, Fast NM. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. Annu Rev Microbiol 2002; 56:93-116.
- (60) Keeling PJ, McFadden GI. Origins of microsporidia. Trends Microbiol 1998; 6(1):19-23.
- (61) Kelkar R, Sastry PS, Kulkarni SS, Saikia TK, Parikh PM, Advani SH. Pulmonary microsporidial infection in a patient with CML undergoing allogeneic marrow transplant. Bone Marrow Transplant 1997; 19(2):179-182.
- (62) Kotler DP, Orenstein JM. Clinical syndromes associated with microsporidiosis
Adv Parasitol 1998; 40:321-349.

- (63) Koudela B, Kucerova S, Hudcovic T. Effect of low and high temperatures on infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water
Folia Parasitol (Praha) 1999; 46(3):171-174.
- (64) Lambl BB, Federman M, Pleskow D, Wanke CA. Malabsorption and wasting in AIDS patients with microsporidia and pathogen-negative diarrhea
AIDS 1996; 10(7):739-744.
- (65) Lanternier F, Boutboul D, Menotti J, Chandesris MO, Sarfati C, Mamzer Bruneel MF et al. Microsporidiosis in solid organ transplant recipients: two *Enterocytozoon bieneusi* cases and review
Transpl Infect Dis 2008.
- (66) Larsson JJ. Molecular versus morphological approach to microsporidian classification. Folia Parasitol (Praha) 2005; 52(1-2):143-144.
- (67) Leitch GJ, He Q, Wallace S, Visvesvara GS. Inhibition of the spore polar filament extrusion of the microsporidium, *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient
J Eukaryot Microbiol 1993; 40(6):711-717.
- (68) Leitch GJ, Scanlon M, Shaw A, Visvesvara GS, Wallace S. Use of a fluorescent probe to assess the activities of candidate agents against intracellular forms of *Encephalitozoon microsporidia*
Antimicrob Agents Chemother 1997; 41(2):337-344.
- (69) Li X, Palmer R, Trout JM, Fayer R. Infectivity of microsporidia spores stored in water at environmental temperatures
J Parasitol 2003; 89(1):185-188.
- (70) Magaud A, Achbarou A, Desportes-Livage I. Cell invasion by the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis*
J Eukaryot Microbiol 1997; 44(6):81S.
- (71) Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic potential of the microsporidia
Clin Microbiol Rev 2005; 18(3):423-445.
- (72) Matsubayashi H, Koike I, Mikata I, Takei H, Hagiwara S. A case of *Encephalitozoon*-like Infection in man. Arch Pathol 1959; 67:181-187.
- (73) McInnes EF, Stewart CG. The pathology of subclinical infection of *Encephalitozoon cuniculi* in canine dams producing pups with overt encephalitozoonosis
J S Afr Vet Assoc 1991; 62(2):51-54.

- (74) Molina JM, Oksenhendler E, Beauvais B, Sarfati C, Jaccard A, Derouin F et al. Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in patients with AIDS: clinical features and response to albendazole therapy
J Infect Dis 1995; 171(1):245-249.
- (75) Molina JM, Tourneur M, Sarfati C, Chevret S, de Gouvello A, Gobert JG et al. Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis
N Engl J Med 2002; 346(25):1963-1969.
- (76) Mota P, Rauch CA, Edberg SC. Microsporidia and Cyclospora: epidemiology and assessment of risk from the environment
Crit Rev Microbiol 2000; 26(2):69-90.
- (77) Muller A, Bialek R, Kamper A, Fatkenheuer G, Salzberger B, Franzen C. Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. J Clin Microbiol 2001; 39(4):1630-1632.
- (78) National Institute of Allergy and Infectious Diseases. (<http://www3.niaid.nih.gov/topics/BiodefenseRelated/Biodefense/research/CatA.htm>). 2009.
- (79) Okhuysen PC. Traveler's diarrhea due to intestinal protozoa
Clin Infect Dis 2001; 33(1):110-114.
- (80) Orenstein JM, Dieterich DT, Kotler DP. Systemic dissemination by a newly recognized intestinal microsporidia species in AIDS. AIDS 1992; 6(10):1143-1150.
- (81) Orenstein JM, Russo P, Didier ES, Bowers C, Bunin N, Teachey DT. Fatal pulmonary microsporidiosis due to *encephalitozoon cuniculi* following allogeneic bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia
Ultrastruct Pathol 2005; 29(3-4):269-276.
- (82) Orenstein JM, Tenner M, Cali A, Kotler DP. A microsporidian previously undescribed in humans, infecting enterocytes and macrophages, and associated with diarrhea in an acquired immunodeficiency syndrome patient. Hum Pathol 1992; 23(7):722-728.
- (83) Peek R, Delbac F, Speijer D, Polonais V, Greve S, Wentink-Bonnema E et al. Carbohydrate moieties of microsporidian polar tube proteins are targeted by immunoglobulin G in immunocompetent individuals
Infect Immun 2005; 73(12):7906-7913.

- (84) Polonais V, Prensier G, Metenier G, Vivares CP, Delbac F. Microsporidian polar tube proteins: highly divergent but closely linked genes encode PTP1 and PTP2 in members of the evolutionarily distant *Antonospora* and *Encephalitozoon* groups
Fungal Genet Biol 2005; 42(9):791-803.
- (85) Rabodonirina M, Bertocchi M, Desportes-Livage I, Cotte L, Levrey H, Piens MA et al. *Enterocytozoon bienersi* as a cause of chronic diarrhea in a heart-lung transplant recipient who was seronegative for human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 1996; 23(1):114-117.
- (86) Rauz S, Tuft S, Dart JK, Bonshek R, Luthert P, Curry A. Ultrastructural examination of two cases of stromal microsporidial keratitis
J Med Microbiol 2004; 53(Pt 8):775-781.
- (87) Ronnebaumer K, Gross U, Bohne W. The nascent parasitophorous vacuole membrane of *Encephalitozoon cuniculi* is formed by host cell lipids and contains pores which allow nutrient uptake
Eukaryot Cell 2008; 7(6):1001-1008.
- (88) Sandfort J, Hannemann A, Gelderblom H, Stark K, Owen RL, Ruf B. *Enterocytozoon bienersi* infection in an immunocompetent patient who had acute diarrhea and who was not infected with the human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 1994; 19(3):514-516.
- (89) Sax PE, Rich JD, Pieciak WS, Trnka YM. Intestinal microsporidiosis occurring in a liver transplant recipient. Transplantation 1995; 60(6):617-618.
- (90) Schwartz DA, Sobottka I, Leitch GJ, Cali A, Visvesvara GS. Pathology of microsporidiosis: emerging parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome
Arch Pathol Lab Med 1996; 120(2):173-188.
- (91) Silveira H, Canning EU. *Vittaforma corneae* n. comb. for the human microsporidium *Nosema corneum* Shadduck, Meccoli, Davis & Font, 1990, based on its ultrastructure in the liver of experimentally infected athymic mice. J Eukaryot Microbiol 1995; 42(2):158-165.
- (92) Snowden K, Logan K, Didier ES. *Encephalitozoon cuniculi* strain III is a cause of encephalitozoonosis in both humans and dogs
J Infect Dis 1999; 180(6):2086-2088.

- (93) Snowden KF, Didier ES, Orenstein JM, Shadduck JA. Animal models of human microsporidial infections. *Lab Anim Sci* 1998; 48(6):589-592.
- (94) Soule JB, Halverson AL, Becker RB, Pistole MC, Orenstein JM. A patient with acquired immunodeficiency syndrome and untreated *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* microsporidiosis leading to small bowel perforation. Response to albendazole
Arch Pathol Lab Med 1997; 121(8):880-887.
- (95) Sprague V, V, Becnel JJ. Note on the Name-Author-Date Combination for the Taxon MICROSPORIDIES Balbiani, 1882, When Ranked as a Phylum
J Invertebr Pathol 1998; 71(1):91-94.
- (96) Sprague V, Becnel JJ, Hazard EI. Taxonomy of phylum microspora
Crit Rev Microbiol 1992; 18(5-6):285-395.
- (97) Teachey DT, Russo P, Orenstein JM, Didier ES, Bowers C, Bunin N. Pulmonary infection with microsporidia after allogeneic bone marrow transplantation
Bone Marrow Transplant 2004; 33(3):299-302.
- (98) van Gool T, Biderre C, Delbac F, Wentink-Bonnema E, Peek R, Vivares CP. Serodiagnostic studies in an immunocompetent individual infected with *Encephalitozoon cuniculi*
J Infect Dis 2004; 189(12):2243-2249.
- (99) Wang Z, Orlandi PA, Stenger DA. Simultaneous detection of four human pathogenic microsporidian species from clinical samples by oligonucleotide microarray
J Clin Microbiol 2005; 43(8):4121-4128.
- (100) Wasson K, Peper RL. Mammalian microsporidiosis. *Vet Pathol* 2000; 37(2):113-128.
- (101) Weber R, Bryan RT. Microsporidial infections in immunodeficient and immunocompetent patients. *Clin Infect Dis* 1994; 19(3):517-521.
- (102) Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. Human microsporidial infections. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7(4):426-461.
- (103) Weber R, Deplazes P, Schwartz D. Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis
Contrib Microbiol 2000; 6:166-192.

- (104) Weiss LM, Michalakakis E, Coyle CM, Tanowitz HB, Wittner M. The in vitro activity of albendazole against *Encephalitozoon cuniculi*
J Eukaryot Microbiol 1994; 41(5):65S.
- (105) Willson R, Harrington R, Stewart B, Fritsche T. Human immunodeficiency virus 1-associated necrotizing cholangitis caused by infection with *Septata intestinalis*
Gastroenterology 1995; 108(1):247-251.
- (106) Wittner M, Weiss LM. The Microsporidia and Microsporidiosis. 1999.
- (107) Wright JH, Craighead E.M. Infectious motor paralysis in young rabbits. J Exp Med 1922; 36:135-141.
- (108) Xu Y, Weiss LM. The microsporidian polar tube: a highly specialised invasion organelle
Int J Parasitol 2005; 35(9):941-953.
- (109) Zhu X, Wittner M, Tanowitz HB, Cali A, Weiss LM. Nucleotide sequence of the small ribosomal RNA of *Encephalitozoon cuniculi*
Nucleic Acids Res 1993; 21(5):1315.

8. Lebenslauf

Name:	Zitzler
Vorname:	Norbert Johannes Paul
Geburtsdatum:	25.04.79
Geburtsort:	Schwandorf
Nationalität:	Deutsch
Familienstand:	Ledig
Konfession:	römisch-katholisch
Eltern:	Johann Zitzler Gabriele Zitzler
Geschwister:	Ingeborg Zitzler
Schul Ausbildung:	
1985 - 1987	Grundschule Obertraubling
1987- 1989	Vorschule der Regensburger Domspatzen Pielenhofen
1989 - 1998	Gymnasium Regensburger Domspatzen
Schulabschluss:	Abitur 1998
Zivildienst:	
1998-1999	Individuelle Schwerbehindertenbetreuung Evangelische Diakonie
Studium:	
1999	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Universität Regensburg
2001	Erfolgreich bestandene Ärztliche Vorprüfung
2002	Erfolgreich bestandener erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005	Erfolgreich bestandener zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2006	Erfolgreich bestandener dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Beruf:	
Seit August 2006	Assistenzarzt für Innere Medizin im Klinikum Donaustauf

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken deren Hilfe diese Arbeit ermöglicht und unterstützt hat.

Besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater und Betreuer Professor Dr. med. Caspar Franzen der mir den Versuchsaufbau dieser Arbeit überlassen hat und mich in den ersten Schritten wissenschaftlichen Arbeitens begleitet hat.

Ebenso geht ein Dankeschön vor allem an Andre Hess, durch dessen tatkräftige Unterstützung eine zügige Durchführung der Versuche möglich war, aber auch an die gesamte Arbeitsgruppe für experimentelle Infektiologie.

Zu guter letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern Johann und Gabriele Zitzler und meiner Schwester Ingeborg Zitzler, die mich nicht nur während der Studienzeit mit allen Mitteln unterstützt haben. Explizit möchte ich mich auch bei meiner Freundin Dr. med. Viola Radeck bedanken, die als moralischer Beistand und ständige Motivation die Vollendung dieser Arbeit ermöglicht hat.